

**Untersuchungen über den
Nukleinsäuren- und Proteingehalt
von Mucosazellen bei der
„funktionellen Hypertrophie“
des Rattencaecums**

Werner Resch
Landshut
1974



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der II. Medizinischen Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Untersuchungen über den Nukleinsäuren- und Proteingehalt
von Mucosazellen bei der " funktionellen Hypertrophie "
des Rattencaecums.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians - Universität zu München
vorgelegt von

Werner Resch

aus

Landshut

München

1974



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München.

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. K. Loeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1974

Meinem Vater in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis.

	Seite
<u>Einleitung</u>	3
<u>Methodik</u>	
Tiermaterial, Unterbringung und Fütterung	11
Trinkversorgung	11
Spezielle Methodik	11
I) Präparation	12
a) Isolierung der Caecumschleimhaut	12
b) Abschabung von Epithelzellen	15
II) Histologie	15
III) Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Zellhomogenat	19
IV) DNA - Bestimmung : Indol - Methode	21
V) RNA - Bestimmung : Orcin - Methode	24
VI) Protein - Bestimmung : Phenol - Folin - Methode	27
Statistische Auswertung	30
<u>Ergebnisse</u>	
I) Klinische Beobachtungen am Gesamttier	31
II) Makroskopische Beobachtungen am Caecum	31
III) Feuchtgewicht, Trockengewicht und Wassergehalt der isolierten Caecum - Mucosa	32
IV) Bestimmungen von DNA, RNA und Protein in der isolierten Mucosa	37
A) Mengen von DNA, RNA und Protein	37
B) Prozentuale Änderungen von DNA, RNA und Protein	40
C) Konzentrationen von DNA, RNA und Protein pro 100 mg Feuchtgewicht	40
D) Quotienten von DNA, RNA und Protein zueinander	40
E) Schlußfolgerungen	44
V) Bestimmung von DNA, RNA und Protein in abgeschabten Epithelzellen der Mucosa, sowie im nach Abschabung verbliebenen Schleimhautrest	44
VI) Prüfung der Reversibilität	46
<u>Diskussion</u>	
A) Besprechung der angewendeten Methodik	48

B)	Besprechung der Versuchsergebnisse	Seite 52
C)	Beziehung zwischen Mucosahyperplasie und Transportfunktion	58
D)	Vergleiche mit morphologischen und transport- physiologischen Adaptationsphänomenen anderer Organe	61
	<u>Zusammenfassung</u>	63
	<u>Literaturverzeichnis</u>	65

Einleitung.

Neben anderen Kennzeichen eines lebenden Organismus wie Reizbarkeit, Stoffwechsel, Energiehaushalt und Fortpflanzung sind Wachstum und Differenzierung von elementarer Bedeutung für jedes einzelne Lebewesen. In allen diesen Lebensvorgängen beherrschen Mensch, Tier und Pflanze einen Regulationsmechanismus, der es ihnen erlaubt, trotz einer wechselhaften Umgebung die physiologischen Abläufe des Organismus innerhalb gewisser Grenzen konstant zu halten. Dabei können die Außenbedingungen ihrerseits als Entwicklungsreize auf den Organismus einwirken und morphologische und funktionelle Reaktionen hervorrufen. Diese Fähigkeit von Organen und Geweben, Milieuänderungen durch Anpassung (Adaptation) zu beantworten, wird als Ergebnis einer lang dauernden natürlichen Selektion aufgefaßt (14,52). Ein Adaptationsprozess zielt definitionsgemäß darauf ab, neuen Anforderungen entweder durch eine grundlegende, anhaltende Umstellung des gesamten Organismus besser gewachsen zu sein, oder aber spezielle Mechanismen zu entwickeln, welche die bisherige Funktionsweise trotz veränderter Bedingungen im Prinzip beizubehalten gestatten (7).

Über adaptative Prozesse im Magen - Darm - Trakt ist bisher relativ wenig bekannt. Da das Epithelgewebe des Verdauungskanals vorwiegend mit der Resorption von Energieträgern und Baustoffen aus der zugeführten Nahrung befaßt ist, steht es in direktem Kontakt mit der Außenwelt und ist deshalb den Umweltfaktoren in besonderem Maße ausgesetzt. Prinzipiell bestehen für jedes Gewebe zwei Möglichkeiten adaptativ zu reagieren: Es kann entweder die Masse oder die Funktion seiner Einzelzellen ändern. Wenn auch heute als gesichert angenommen werden darf, daß enterale Schleimhäute beide Vorgänge getrennt oder gleichzeitig zeigen können, so sind doch die Einzelheiten des pathophysiologischen Ablaufs solcher Prozesse nur teilweise geklärt.

Anpassungserscheinungen durch Änderung der Zellmasse treten z.B. nach Resektionen oder Ausschaltung von Dünndarmschlingen

durch by - pass - Anastomosen auf. So weiß man seit langem, daß Hunde und Ratten nach experimentellen Resektionen, die bis zu 75 % der Dünndarmlänge betrugen, diesen Ausfall durch verstärkte Regeneration der verbliebenen Zellen weitgehend ausgleichen können (5,21,36,79,98). Die Zunahme der Gewebsmasse geschieht in diesen Fällen durch Vermehrung der Zellen, wodurch auch die Resorption verschiedener Substanzen erhöht wird. Die Transportaktivität pro Zelle bleibt jedoch unverändert oder ist sogar herabgesetzt (19,29,68,76,99). Demnach kommt es nach Resektionen zu keiner Steigerung der Zellfunktion. Dagegen können als Beispiele für eine funktionelle Adaptation im tierischen Verdauungstrakt die Effekte des Hungerns im Gegensatz zur Nahrungsaufnahme (69), sowie die diätetische Manipulierbarkeit der Disaccharidase - Aktivität des Dünndarmbürstensaums angeführt werden: Füttert man fastende Ratten mit kohlenhydratreicher Nahrung, so steigen die Aktivitäten der Maltase und der Saccharidase pro Mucosagewicht oder -protein an. Bei Verabreichung einer proteinreichen Kost tritt diese Aktivitätssteigerung nicht auf (15).

Beim Menschen zeigt die Darmschleimhaut ein ähnliches Anpassungsverhalten. 1955 berichteten Jackson und Linder (43) über post - mortem - Untersuchungen an dünn darmresezierten Patienten. Sie beschrieben eine " Hypertrophie " des verbliebenen Darmrests mit Verdickung der Schleimhaut- und Muskelschicht. Bei peroral ausgeführten Biopsien an Patienten, die ebenfalls dünn darmreseziert waren, stellte Porus eine Zunahme der Epithelzellzahl pro Zotte fest (81). Bei der chirurgischen Therapie der Enteritis regionalis (Morbus Crohn) ist nach Dünndarmresektionen, die die Hälfte des vorhandenen Darmes betreffen, mit latentem, nur labormäßig erfaßbarem, nach Resektionen, die zwei Drittel der Gesamtlänge des Darms erfassen, mit klinisch manifestem Malabsorptionssyndrom zu rechnen (82). Booth et al. fanden nach Resektion von 240 cm distalen Dünndarms lediglich einen Vitamin B₁₂ - Aufnahmedefekt, der mit dem Wegfall der spezifischen Resorptionsfläche für Vitamin B₁₂ erklärt war (6). Das Fehlen anderer Resorptionsstörungen, zusammen mit den obigen Befunden, zeigt, daß auch der menschliche

Darm nach Resektionen durch Zellmassenvermehrung reagiert und ebenso wie der tierische Darm große morphologische Reserven besitzt. Einen indirekten Hinweis auf funktionelle Anpassungserscheinungen geben neuere Untersuchungen bei der Dünndarmschaltung zur Therapie der extremen Adipositas. Die dabei angelegte Jejunoileostomie führt zu einer Malabsorption, zu Durchfällen und damit zu tiefgreifenden Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt. Postoperative Langzeitverlaufskontrollen von Natrium, Kalium, Calcium und Chlorid im Serum, sowie der Vitamin- und Eiweißresorption zeigten aber, daß sich diese Werte im Laufe der Zeit wieder normalisieren (42).

Ein Darmabschnitt, für den sowohl morphologische als auch funktionelle Adaptationsprozesse bereits gesichert sind, ist das Caecum der Ratte. Bei Versuchen mit keimfreien Tieren war - vor allem bei Nagern - von Anfang an deren stark vergrößertes Caecum aufgefallen. Bereits Nuttal und Thierfelder beobachteten dies an keimfreien Meerschweinchen, als sie 1896 schrieben: " ... der Blinddarm war stark aufgetrieben und mit brauner, käsig geronnener Flüssigkeit schwappend gefüllt " (78). Da keimfreie Tiere zugleich an einer chronischen Diarrhoe leiden, wurde vermutet, daß die Vergrößerung des Caecums mit einer schlechteren Wasserresorption einherginge (31,32,33,94). Das Gegenteil stellte sich jedoch als richtig heraus, denn die Nettoresorptionsrate für Natrium und Wasser (pro Oberfläche oder Gewichtseinheit) erwies sich im Vergleich zu konventionellen Ratten als erheblich gesteigert (61). Die Durchfälle der Tiere waren demnach von der Funktion der " hypertrophierten " Schleimhaut her nicht zu erklären. Andererseits war bekannt , daß sich im Caecum wegen des fehlenden bakteriellen Abbaus endogene, osmotisch wirksame Substanzen (vor allem Mukopolysaccharide und Proteine) ansammeln (58,60), welche für die gefundene Wasserretention verantwortlich sein konnten (61). Der gesteigerte, natriumgekoppelte Wassertransport könnte deshalb als eine Art adaptativer Gegenregulierungsprozess aufgefaßt werden, der zur Vermeidung exzessiver Flüssigkeitsverluste des Tieres in Gang gesetzt wird.

War diese Theorie richtig, dann mußte sich der Effekt der Caecumvergrößerung und der Funktionssteigerung auch an normalen Ratten durch Verabreichung genügend großer, nicht resorbierbarer und osmotisch wirksamer Moleküle erzielen lassen. Man verwendete für diese Experimente das alle diese Voraussetzungen erfüllende Polymer Polyäthylenglykol (PEG) und setzte es einfach dem Trinkwasser der Tiere zu. Wie die Ergebnisse zeigten, konnte die aufgestellte Hypothese bestätigt werden (62). Damit besaß man ein brauchbares Modell, an dem sich eine durch diätetische Maßnahmen ausgelöste Adaptation des intestinalen Elektrolyttransports untersuchen ließ. Dieser Versuchsaufbau war den aufwendigen Untersuchungen an keimfreien Tieren durch Einfachheit und Kostenersparnis weit überlegen.

Mit diesem Modell befaßten sich nun Studien des Ionen- und Wassertransports, einschließlich von Messungen der elektrischen Potentialdifferenz und der spezifischen Aktivität verschiedener Enzyme (62,63). Während die Makro - Oberfläche und das Trokengewicht des Caecums kontinuierlich anwachsend sich erst nach zwei Monaten verdreifacht bzw. verdoppelt hatten, erreichte der (am narkotisierten Tier in vivo gemessene) Anstieg der Natrium- und Volumennettoresorptionsrate sein Maximum schon in einer Woche. Im elektrochemischen Gleichgewichtszustand (stationary state) wurden größere transmurale Konzentrationsdifferenzen für Natrium und Chlorid - nicht aber für Kalium - nachgewiesen. Die elektrische Potentialdifferenz zwischen Caecumlumen und Blut stieg an, d.h. das Lumen wurde elektrisch stärker negativ. Während die Aktivität der Magnesium - ATPase sowie mehrerer anderer Enzyme der Schleimhaut unverändert blieb, nahm die Na^+ - K^+ - ATPase - Aktivität pro Oberflächeneinheit, Feuchtgewicht oder Protein der " hypertrophierten " Schleimhaut zu. Dies ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil dieses Enzym in eine enge Beziehung mit dem aktiven Natriumtransport gebracht wird (88,89). Bestimmungen der mikrosomalen Na^+ - K^+ - ATPase - Aktivität pro Protein zeigten darüber hinaus, daß die Aktivitätssteigerung zeitparallel zu der Steigerung des Natriumnetto- transports verlief (90). Diese Befunde wurden zusammengefaßt dahingehend interpretiert, daß der aktive Natriumtransport in der Caecum - Mucosa der PEG behandelten Ratte stark gesteigert

ist, während sich für den Transport von Chlorid, Kalium und Bicarbonat nur geringe Änderungen ergaben (63, 64).

In diesen Untersuchungen waren die Funktionsparameter auf das Gewicht, die Oberfläche oder den Proteingehalt des vergrößerten Organs bezogen worden und bewiesen infolgedessen nur einen Mehrtransport pro Gewebsmasse. Zelluläre Aspekte an diesem Modell waren dagegen noch nicht betrachtet worden. Da bis jetzt nicht bekannt war, ob es sich bei der Caecumvergrößerung um eine, im Virchow'schen Sinne, Hyperplasie oder Hypertrophie der Epithelzellen handelte, konnten keine Angaben über die Transportaktivitäten pro individueller Einzelzelle erfolgen. Definitionsgemäß liegt eine Hypertrophie dann vor, wenn eine Strukturvermehrung durch Vergrößerung der Einzelelemente der Struktur, also in der Regel der Zellen, erreicht wird. Von Hyperplasie spricht man, wenn die Überentwicklung einer Struktur durch Vermehrung der spezifischen Strukturelemente, also in der Regel der Zellen, bewirkt wird (9).

Für das Caecum keimfreier Ratten lagen bereits morphologische Untersuchungen vor, die in mancherlei Hinsicht Abweichungen von den Befunden am Caecum konventioneller Tiere zeigten. Elektronenmikroskopisch betrachtet, erschienen die Epithelzellen höher und schlanker und die Zellkerne größer. Pro Längeneinheit Basalmembran war die Zellzahl im Vergleich zu normalen Tieren signifikant erhöht. Auch die Mikrovilli erschienen um 25 % länger. Außerdem war die Anlage der Lieberkühn'schen Krypten variationsreicher und die Lamina propria wies Änderungen der Zellzusammensetzung auf, die auf den besonderen immunologischen Status der Keimfreiheit hindeuteten (35). Die höheren Zellen mit ihren vergrößerten Kernen und längerem Bürstensaum konnten auf eine Hypertrophie der Zellen hinweisen. Die Befunde spiegelten aber nur einen histologischen Eindruck wider und wurden nicht zellmorphometrisch quantifiziert. Für das Caecum PEG behandelte Tiere wurden entsprechende Beobachtungen noch nicht publiziert.

Um die Frage einer zellulären Hypertrophie oder Hyperplasie beantworten zu können, sind Parameter pro Zelle erforderlich, wel-

che die Masse von Kern und Cytoplasma angeben. Hierfür ist der Gehalt der Zelle an Nukleinsäuren und Protein geeignet. Auf Grund histochemischer Beobachtungen (23) wurde bald erkannt, daß sich die Desoxyribonukleinsäure (DNA) zu 99 % im Zellkern als Bestandteil der Chromosomen befindet. Nur 1 % der Zell - DNA ist außerhalb des Kerns, z.B. in Mikrosomen, lokalisiert (37). Die Tatsache, daß der DNA - Gehalt einer Zelle eine verhältnismäßig konstante Größe darstellt, die auch durch exogene Einflüsse (Hunger, Vergiftungen) nur wenig beeinflusst wird, hat dazu geführt, ihn als Maß der Kernmasse eines Zellhomogenats zu verwenden (37). Dem gegenüber ist die in einem Gewebe befindliche Proteinmenge ein guter Parameter für die Cytoplasma - Masse, denn die im allgemeinen 10 bis 30 % betragende Trockensubstanz einer Zelle besteht zu 50 bis 60 % aus Eiweißen (77). Cytochemische Untersuchungen weisen darauf hin, daß sich die Ribonukleinsäure (RNA) sowohl im Zellkern (vor allem im Nucleolus und in geringer Menge im Chromatin), als auch im Cytoplasma der Zelle befindet, wo etwa 80 bis 90 % an Ribosomen gebunden sind (r - RNA) und der Rest als lösliche RNA (soluble oder transfer - RNA) vorliegt (37,65). Die Menge der in der Zelle enthaltenen RNA gibt Aufschluß über die momentan stattfindende Proteinbiosynthese.

Diese nimmt ja bekanntlich an der DNA ihren Ausgang. Der erste Schritt besteht darin, daß die doppelsträngige DNA in zwei gleiche Einzelstränge zerlegt wird. Einer dieser Einzelstränge dient im zweiten Schritt als Muster, um aus einem Gemisch der vier vorhandenen Ribonukleosid - Triphosphate eine RNA aufzubauen, die in der Basensequenz der DNA völlig komplementär ist. Der Prozess vollzieht sich unter der Wirkung eines Enzyms, der DNA - abhängigen RNA - Polymerase. Nun fügen sich die beiden DNA - Stränge wieder zum Doppelstrang zusammen, daß " Buch ", aus welchem " abgeschrieben " wurde, wird gleichsam wieder " zugeklappt ". In der Basensequenz einer Nukleinsäure ist Information gespeichert. Dieser Informationsgehalt entscheidet darüber, welche Stoffwechselschritte von der Zelle ausgeführt, und welche Strukturen in der Zelle aufgebaut werden. Die gebildete RNA ist nun nicht mehr an den Zellkern gebunden, sie kann sich frei in der Zelle bewegen und übernimmt die Funktion eines Bo-

ten (messenger - RNA), der den Informationsgehalt der DNA in die Zellflüssigkeit an die Stellen bringt, an denen sich die eigentliche Proteinsynthese vollzieht, an die Ribosomen (Transkription). Dabei wird der Anfangsteil der RNA - Kette an der Ribosomenoberfläche so ausgebreitet, daß die Basen frei herausragen und mit komplementären Basentriplets der cytoplasmatischen soluble - RNA gepaart werden können. An diese haben sich vorher freie Aminosäurereste angelagert, die jetzt zu einer Proteinkette zusammengeknüpft werden. Die soluble - RNA wird dabei wieder frei und kann erneut mit Aminosäuren beladen werden. Das Protein ist nach diesem, als Translation bezeichneten Vorgang, zunächst in seiner Primärstruktur fertig, faltet sich dann ohne Zutun anderer Zellfaktoren von selbst zur Sekundär- und Tertiärstruktur zusammen. Damit ist die Proteinbiosynthese abgeschlossen (18,37,46,49,51).

Der mechanischen und funktionellen Belastung des Darmepithels entspricht ein rascher Zellwechsel mit nur kurzer Lebenszeit der Einzelzelle. Beim Menschen beträgt sie für die Darmepithelzelle etwa 3 bis 5 Tage (67). Bei der Ratte fanden Messier und Leblond (72), daß sechs Stunden nach Injektion von Thymidin - H^3 in der Mitte von Lieberkühn'schen Krypten des Colon ascendens zahlreiche radioaktiv markierte Zellen auftreten. Nach 24 Stunden waren diese Zellen bereits entlang beider Kryptenseiten zur Oberfläche hin gewandert und nach drei Tagen zum größten Teil in das Lumen abgestoßen. Daraus kann man schließen, daß die Kryptenmitte die Regenerationszone darstellt. Der eigentliche Kryptengrund, in dem die Markierung spärlich und etwa drei Wochen lang nachweisbar war, hat offenbar nur einen langsamen Zellumsatz. Bei einem Mitose - Index¹ von 8.9 % betrug der Radioaktivitäts - Index² für das Colon 9.8 %. Da ein Radioaktivitäts - Index von über 3 % als ein Zeichen dafür aufgefaßt wird, daß die Zellproduktion größer ist als dem normalen Wachstum des Körpers entspricht (59), dient die Zellproliferation im Colon offensichtlich in erster Linie dem Ersatz durch Zellverlust und

¹ Anzahl der Zellen in Mitose / Anzahl der Zellen im proliferativen Zyklus

² Anzahl der Zellen in der S - Phase der Teilung / Anzahl der Zellen im proliferativen Zyklus = % markierte Zellen

nicht dem eigentlichen Wachstum. Gewebe, die solche Erscheinungen aufweisen, werden als "renewing cell populations" bezeichnet (54). Bei ihnen ist - im Gegensatz z.B. zur Leber oder dem Übergangsepithel der Harnblase (= "expanding tissue") - nicht mit dem Auftreten polyploider Zellen zu rechnen (72). Eine Bestimmung der Nukleinsäuren und des Proteins kann die Frage der Zellhyperplasie oder -hypertrophie des vergrößerten Rattencaecums also eindeutig beantworten.

In der Diskussion wurden die aus früheren Untersuchungen stammenden Daten des Natriumtransports (63) zu den jetzt erhaltenen Ergebnissen in Beziehung gesetzt, um ein Maß für den Natriumtransport pro Zelle zu erhalten.

Methodik.

Tiermaterial, Unterbringung und Fütterung.

Bei unseren Versuchen fanden ausschließlich männliche SPF - Ratten vom Typ Wistar, Stamm TNO W 70, (Fa. Winkelmann, Kirchborchen) Verwendung. Damit sich die Tiere nach dem Versand auf die neue Umgebung einstellen konnten, wurden sie zunächst 8 Tage lang unter den Bedingungen unseres Tierstalles gehalten und erst dann in den Versuch genommen. Bei Versuchsbeginn lag das Körpergewicht zwischen 150 und 250 g.

Die Tiere wurden bei uns in Versuchskäfigen aus Makrolon (Fa. Süssle & Schmidt KG, Unterpfaffenhofen) Größe III untergebracht. Diese Käfige weisen eine Sitzfläche von 900 cm^2 auf. Sie wurden mit fünf Ratten pro Käfig besetzt. Im Tierstall herrschte eine konstante Temperatur von 22°C , die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50 bis 60 %. Der Unterbringungsraum war einem 12 Stunden Tag - Nacht - Rhythmus unterworfen, d.h. der Raum war 12 Stunden durch Neonröhrenlicht erhellt und anschließend 12 Stunden dunkel.

Die Fütterung erfolgte mit Standard - Rattenfutter (Fa. Altromin GmbH, Lage, Haltungsdiät Nr.1320, 10.0 mm Preßlinge), das aus der Deckelraufe ad libitum aufgenommen wurde.

Trinkversorgung.

Die Ratten wurden in zwei Gruppen geteilt :

a) Tiere, die als Kontrollen dienen sollten, erhielten Frischwasser aus Makrolon - Tränkflaschen (500 ml) mit Tränknippel aus rostfreiem Edelstahl ad libitum.

b) Die dem eigentlichen Versuch dienende Tiergruppe erhielt eine selbst hergestellte 16 % ige Lösung von Polyäthylenglykol Type 4000, MG 3000 - 3700 (Fa. Serva - Feinbiochemie, Heidelberg), gelöst in Leitungswasser, ebenfalls ad libitum. Die Osmolalität dieser Lösung betrug 300 mOsm/kg .

Spezielle Methodik.

Um eventuelle biologische Schwankungen auf ein Minimum zu redu-

zieren, wurden alle Tiere gleichzeitig in den Versuch genommen. Aus beiden Gruppen - der " PEG - Tiere " und der Kontrollen - wurde nach 2,4,7,14,28 und 56 Tagen die jeweils benötigte Anzahl von Tieren entnommen. Es wurde darauf geachtet, daß die Tötung immer zur gleichen Tageszeit (8.30 Uhr) erfolgte.

I. Präparation.

Alle Tiere wurden durch zehnminütige tiefe Äthernarkose getötet und anschließend zur Bestimmung des Körpergewichts gewogen. Durch einen medianen Längsschnitt wurde sodann die Bauchhöhle eröffnet und das Caecum aufgesucht (Abbildung 1). Beim Herauslösen des Organs aus seiner Umgebung war die Schnittführung immer so angelegt, daß die Abtrennung des Colon ascendens direkt an seinem Austritt aus dem Caecum und die des terminalen Ileums unmittelbar an seinem Eintritt in den Blinddarm erfolgte. Nach dem Herausnehmen wurde das Caecum vom Mesocaecum freipräpariert, an seiner kleinen Kurvatur der Länge nach aufgeschnitten, durch Ausstreichen mit einer Pinzette von den Faeces befreit und kurz in eiskalter 0.9 % iger Kochsalzlösung gewaschen. Dann wurde es mittels zweier Pinzetten so auf Filterpapier ausgebreitet, daß die Mucosa nach oben und die Serosa nach unten zu liegen kam. Die Mucosa wurde jetzt vorsichtig mit Filterpapier abgetupft, um Reste der Kochsalzlösung zu entfernen.

a) Isolierung der Caecumschleimhaut.

Für die Bestimmung des Feucht- und Trockengewichts der Mucosa sowie für die Ermittlung ihres DNA-, RNA- und Proteingehalts war es notwendig, die Schleimhaut vom Caecum abzutrennen. Dies geschah: mit dem scharfen Rand eines Mikroskop - Deckplättchens. Das Caecum wurde dazu mit einer anatomischen Pinzette am Rand festgehalten und die Mucosa durch vorsichtiges Schaben vom Rand her abgetrennt. Es verblieb nach dieser Behandlung nur eine dünne, durchsichtige Schicht, welche die größeren Gefäßäste, Muskulatur und den Serosaüberzug enthielt (Abbildung 2). Es ist klar, daß die Schleimhaut auf diese Weise nur semiquantitativ gewonnen werden konnte.

Zur Gewichtsbestimmung wurde die so gewonnene Schleimhaut sogleich in ein vorgewogenes, verschließbares Glasgefäß gebracht.

Das Gefäß mit der Mucosa wurde gewogen (Mucosafeuchtgewicht) und anschließend in den Wärmeschrank gebracht. In Vorversuchen war ermittelt worden, daß nach 24 Stunden bei 100° C alles Wasser verdunstet war und keine weitere Gewichtsabnahme mehr zu verzeichnen war. Daher wurde das Glasgefäß für diese Zeit bei dieser Temperatur im Wärmeschrank gehalten, danach wieder gewogen und so das Trockengewicht der Schleimhaut festgestellt. Aus der Differenz von Feucht- und Trockengewicht ergab sich der Wassergehalt der Mucosa.



Abbildung 1

Größenvergleich des Caecums einer 56 Tage mit Polyäthylenglykol - Lösung gefütterten Ratte (rechts) mit dem Caecum einer normalen Ratte (links). Etwa einhalbfache natürliche Größe.

Für die Bestimmung des DNA-, RNA- und Proteingehalts wurde die isolierte Mucosa gewogen, in eine feuchte Kammer gebracht (geschlossenes Plastikgefäß) und dort bei + 4° C bis zur Weiterverarbeitung, die nach kurzer Zeit erfolgte, im Kühlraum aufbewahrt. Das Gewebe wurde nun in jeweils 5.0 ml eiskaltem Aqua

bidest. drei Minuten bei 1500 Umdrehungen / Minute durch 36 strokes homogenisiert (Homogenisator Potter S, Typ Potter - Elvehjem, Fa. Braun - Melsungen). Das erhaltene Homogenat wurde dann auf 1 : 20 verdünnt. Diese Bedingungen wurden in Vorversuchen ermittelt, bei denen die Homogenisierungszeit bei gleichbleibender Umdrehungszahl des Geräts so lange variiert wurde, bis in einer bestimmten Probemenge Mucosagewebe der Nukleinsäure- und Proteingehalt konstant blieb. Sie gewährleisten eine gleichmäßige Zermahlung des Gewebes und die Aufschließung von Zellen und Zellkernen.



Abbildung 2

Isolierung der Mucosa des auf Filterpapier ausgebreiteten Caecums mittels eines Mikroskop - Deckplättchens (rechte Hand). Im Präparat links die nach der Abschabung verbliebene dünne, durchsichtige Schicht, in der Mitte die bereits abgeschabte, zusammengerollte Mucosa und rechts der ursprüngliche Zustand.

b) Abschabung von Epithelzellen.

In anderen Experimenten wurde nicht die gesamte Schleimhaut abgetrennt, sondern versucht, eine reine Epithelzellfraktion zu gewinnen. Dies geschah durch vorsichtiges, oberflächliches Abstreichen des Epithels von dem auf Filterpapier ausgebreiteten Caecum mit dem Deckplättchen. Erst dann wurde der Schleimhautrest in gewohnter Weise abgetragen und beide Anteile wie oben angeführt gewogen und homogenisiert.

II. Histologie.

Um die praktische Durchführbarkeit des Isolierungsverfahrens zu demonstrieren, wurden verschiedene histologische Präparate angefertigt. Dabei ergaben sich zwischen Präparaten, die von Normaltieren und von PEG - behandelten Tieren stammten, keine uns erkennbaren Unterschiede.

Abbildung 3 zeigt einen Längsschnitt durch die gesamte Wand des Caecums einer in diesem Fall 56 Tage PEG - behandelten Ratte. Deutlich zu erkennen sind für das Caecum und Colon typische Lieberkühn'sche Krypten und der Vierschichtenbau der Darmwand. Lumenwärts sieht man die Tunica mucosa, bestehend aus Lamina epithelialis mucosae mit einschichtigem Zylinderepithel. Die schwarz angefärbten Becherzellen enthalten PAS - positiven Schleim. Auffallend sind die Interzellulärspalten, die während Wasserresorption auftreten. Als weitere Bestandteile der Tunica mucosa folgen Lamina propria mucosae aus retikulärem Bindegewebe und die Lamina muscularis mucosae mit Zügen glatter Muskulatur. In der Tela submucosa, bestehend aus kollagen und elastischen Fasern sowie zahlreichen Bindegewebszellen, verlaufen Blut- und Lymphgefäße, welche die Tunica mucosa versorgen. Der ebenfalls in dieser Schicht verlaufende Plexus submucosus (Meissner'scher Plexus) ist auf der Abbildung nicht zu erkennen. Es folgt die Tunica muscularis mit innerer Rings- und äußerer Längsmuskulatur. Dazwischen sieht man den Plexus myentericus (Auerbach'scher Plexus). Den Abschluß bildet die nur unten rechts sichtbare Tunica externa. (r56).

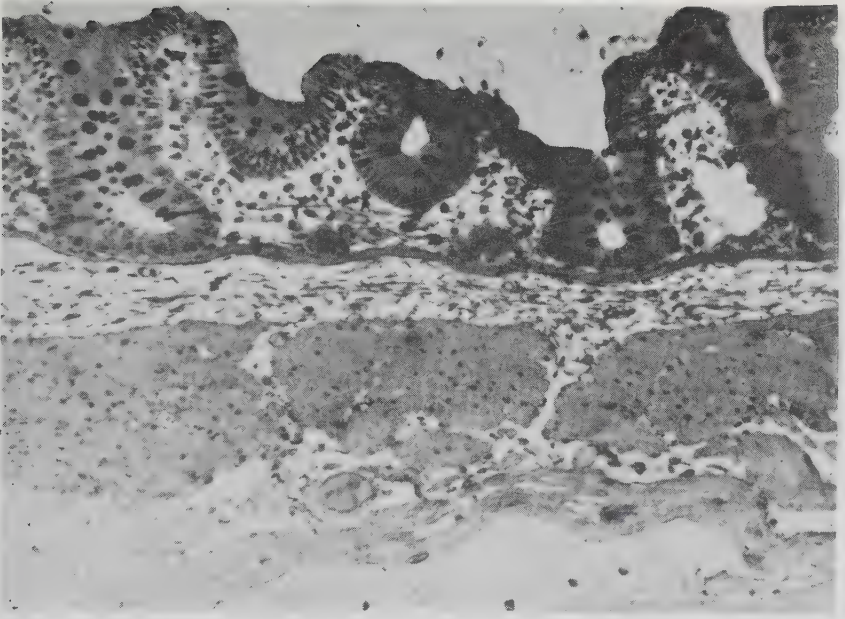


Abbildung 3

Längsschnitt durch die gesamte Wand des Rattencaecums. Deutlich zu erkennen ist der typische Vierschichtenbau der Darmwand mit Tunica mucosa, Tela submucosa, Tunica muscularis und Tunica externa (von oben nach unten). Fixierung in Formalin, PAS - Färbung, Vergrößerung etwa 360 x.

Die natürliche anatomische Grenze, welche die Lamina muscularis mucosae zur Tela submucosa hin bildet, erklärt, warum sich die gesamte Tunica mucosa verhältnismäßig einfach von der Darmwand abtrennen läßt. Abbildung 4 zeigt eine abgetrennte, isolierte Tunica mucosa mit ihren drei Bestandteilen.



Abbildung 4

Längsschnitt durch die isolierte Tunica mucosa des Ratten-caecums. Tiefe Krypten, einschichtiges Zylinderepithel mit Becherzellen, lockeres Bindegewebe und Lamina muscularis mucosae. Fixierung in Formalin, HE - Färbung, Vergrößerung etwa 100 x.

Abbildung 5 zeigt, was nach der Abtrennung der Tunica mucosa mit dem Deckplättchen von der Wand des Caecums übrigblieb. Die Tela submucosa ist nicht mehr vollständig erhalten. Die fehlenden Anteile ihres lockeren Bindegewebes dürften teilweise der Mucosaschicht anhängen oder auch bei der Aufarbeitung des Präparats verloren gegangen sein. Die beiden Muskelschichten der Tunica muscularis bilden den Hauptbestandteil des Präparats.

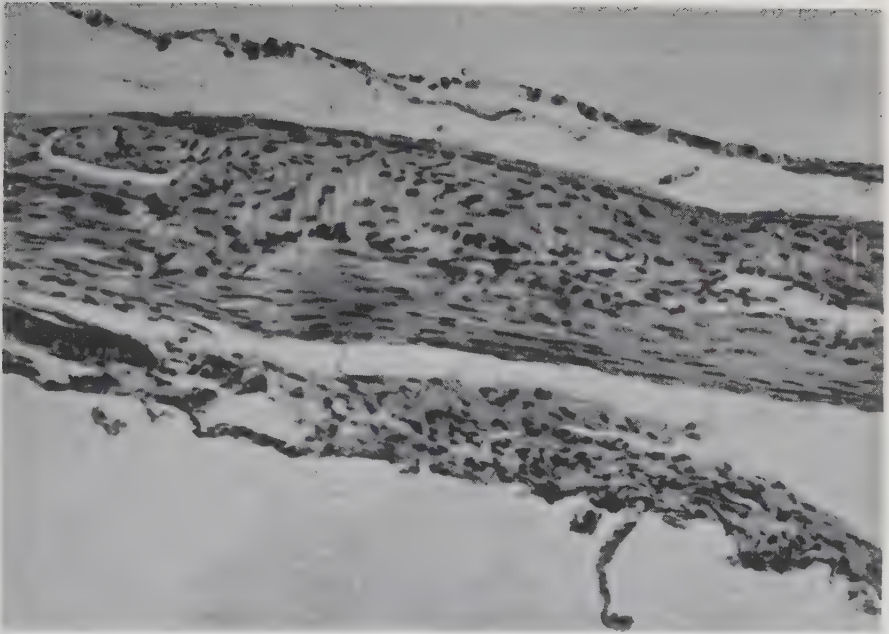


Abbildung 5

Längsschnitt durch das Rattencaecum nach Entfernung der Tunica mucosa. Von oben nach unten sind Anteile der Tela submucosa, die Ring- und Längsmuskelschicht der Tunica muscularis, sowie Reste der Tunica externa zu erkennen. Fixierung in Formalin, HE - Färbung, Vergrößerung etwa 400 x.

In Abbildung 6 sieht man eine oberflächlich abgeschabte Epithelzellschicht als Quetschpräparat. Die Krypten der Schleimhaut stellen sich bei der Aufsicht als kraterähnliche Gebilde dar, die von einem Wall aus Epithelzellen der Lamina epithelialis mucosae umgeben sind. Bindegewebszellen, im Originalpräparat bei Färbung nach Pappenheim (11) hellrot bis rot - orange gefärbt, bildeten nur einen sehr geringen Prozentsatz (etwa 1 %) aller dargestellten Zellen. Anteile der Lamina muscularis mucosae waren nicht zu erkennen. Da also mit dieser Technik der oberflächlichen Zellabschabung offensichtlich nur die Spitzen der ins Darmlumen vorragenden Krypten erfaßt wurden, ließ sich eine praktisch reine Epithelzellfraktion gewinnen.

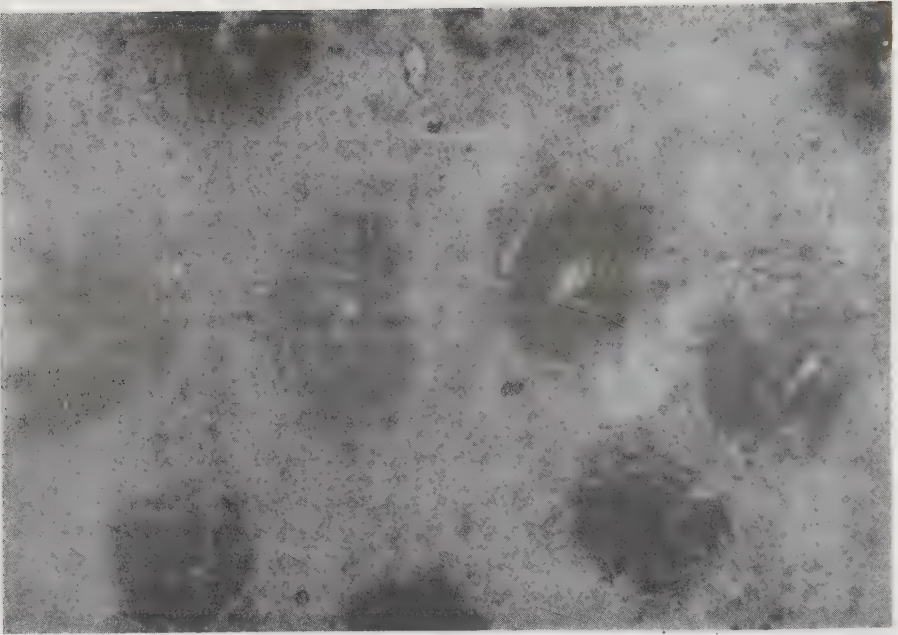


Abbildung 6

Quetschpräparat einer oberflächlich abgeschabten Epithelzellfraktion des Rattencaecums. Das Präparat enthält zahlreiche Epithelzellen, die wallartig einige Krypten umgeben, wenig Bindegewebszellen der Lamina propria mucosae und keine Anteile der Lamina muscularis mucosae. Fixierung in Formalin, Färbung nach Pappenheim, Vergrößerung etwa 400 x.

III. Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Homogenat.

Das Verfahren basiert auf Beobachtungen von Steudel und Peiser (93), die beschrieben, daß Hefe - Nukleinsäure (RNA) in 24 Stunden bei 15° bis 17° C durch Alkali hydrolysiert wird, während Thymus - Nukleinsäure (DNA) unter diesen Bedingungen stabil bleibt. Der Mechanismus der unterschiedlichen Resistenz gegen Alkali wurde durch Fono (27), Brown und Todd (8) aufgeklärt. Zwischen benachbarten Nukleotiden ist sowohl in der DNA als auch in der RNA als Zwischenglied ein 3,5 Phosphodiester eingebaut. Setzt man nun der RNA Alkali zu, so bildet

dieser Ester mit der Hydroxylgruppe an C₂ der Ribose einen zyklischen Triester, der spontan hydrolysiert und 2' oder 3' Nukleotide abwirft. In der DNA besitzt die Desoxyribose keine Hydroxylgruppe an C₂ und kann deshalb bei Zusatz von Alkali keinen zyklischen Triester bilden. Dieses unterschiedliche Verhalten der Nukleinsäuren gegen Alkali wurde von Schmidt und Thannhauser dazu benutzt, DNA und RNA aus dem Gewebe zu entfernen und zu trennen (91). Das Gewebshomogenat wird nach vorausgehenden Reinigungsprozessen in Alkali gegeben, welches die RNA in Produkte hydrolysiert, die bei Ansäuerung nicht mehr ausfallen. Die DNA jedoch widersteht dem Alkaliangriff und fällt deshalb bei der späteren Ansäuerung aus (74,75).

Geräte und Reagentien:

Eppendorf Reaktionsgefäße 3810; Eppendorf Mikroliterpipetten zu 200 ul, 500 ul und 1000 ul; Eppendorf Rotationsmischer 3300; Eppendorf Zentrifuge 3200; Sarstedt Einwegspatel; 10.0 ml Meßkolben; 20.0 ml Meßkolben; Kühlraum 4° C; Wasserbad 37° C.

Perchlorsäure 0.2 n, 0.6 n und 1.2 n

Kalilauge 0.3 n

Aqua bidest.

(Alle Reagentien aus der Apotheke der Universitätskliniken
- München)

Durchführung:

Wir haben uns an das Verfahren nach Fleck und Begg (24) gehalten. In Abänderung der Originalbeschreibung wurde jeweils nur ein Fünftel der dort beschriebenen Volumina verwendet. 1.0 ml des Mucosahomogenats wurde in ein Eppendorf - Reaktionsgefäß pipettiert und 0.5 ml 0.6 n eiskalte Perchlorsäure dazugegeben. Nun wurde zwei Minuten gründlich gemischt, zehn Minuten in Eis gekühlt und fünf Minuten zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 1.0 ml 0.2 n eiskalter Perchlorsäure gewaschen (d.h. der Niederschlag wurde mit einem Einwegspatel aufgerührt, zwei Minuten gemischt und fünf Minuten zentrifugiert). Die Waschflüssigkeit wurde ebenfalls verworfen und eventuell

überschüssige Säure am Gefäßrand mit Filterpapier entfernt. Damit waren die Reinigungsprozesse abgeschlossen und kleine Moleküle sowie Fette aus dem Homogenat entfernt.

Zum verbleibenden Niederschlag, der nur mehr DNA, RNA und Protein enthielt, wurde nun 1.0 ml 0.3 n 37° C warme KOH pipettiert, aufgerührt, fünfzehn Minuten gründlich gemischt und die Lösung eine Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde sie zehn Minuten in Eis gestellt, und dann 0.5 ml eiskalte 1.2 n Perchlorsäure dazugegeben, um die DNA und das Protein auszufällen. Es wurde wieder zwei Minuten gemischt, die Lösung zehn Minuten in Eis gestellt und dann fünf Minuten zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand, der jetzt nur die RNA - Fraktion enthielt, wurde in einen 20.0 ml Meßkolben abgegossen. Der verbliebene Niederschlag wurde zweimal mit je 1.0 ml 0.2 n Perchlorsäure gewaschen und die Waschflüssigkeit ebenfalls in den Meßkolben gegeben. Zusätzlich kamen noch 2.0 ml 0.6 n Perchlorsäure in diesen Meßkolben, dann erst wurde er mit Aqua bidest. auf 20.0 ml aufgefüllt. Nun hatte man eine Lösung der aus dem Homogenat extrahierten RNA in 0.1 n Perchlorsäure. Zum Niederschlag, der nach der letzten Waschung frei von RNA war, wurde nun 1.0 ml 0.3 n KOH gegeben, aufgerührt, fünfzehn Minuten gut gemischt und nochmal fünf Minuten bei 37° C im Wasserbad inkubiert. In einen 10.0 ml Meßkolben wurden 2.5 ml 0.3 n KOH pipettiert und die Lösung dazugegeben. Der Meßkolben wurde mit Aqua bidest. auf 10.0 ml aufgefüllt und wir hatten eine Lösung der aus dem Homogenat extrahierten DNA in 0.1 n KOH, in der sich auch das Protein des Homogenats befand.

IV. DNA - Bestimmung : Indol - Methode.

Die bekannten Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Nukleinsäuren basieren teilweise auf der Bestimmung des Phosphors, oder des Zuckeranteils und teilweise auf der Bestimmung beider. 1929 zeigte Dische (16), daß Indol mit DNA eine Farbreaktion ergibt. Es reagiert aber auch mit verschiedenen Zuckern und aliphatischen Aldehyden, die Farbe, die durch die Reaktion mit diesen Substanzen gebildet wird, läßt sich jedoch leicht mit Chloroform ausziehen (74). 1952 beschrieb Ceriotti (12) eine sehr empfindliche Methode zur Bestimmung der DNA, die

hier Verwendung fand.

Geräte und Reagentien:

Sehr saubere 15 ml Glas - Zentrifugengläser, Aluminiumfolie, Wasserbad 100° C, Zentrifuge, Eppendorf Photometer 1101 M, Glasküvetten 1 cm Schichtdicke.

0.1 n KOH, Indol p.a. ($C_8 H_7 N$), Kupfer II sulfat p.a. ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$), Salzsäure konz. p.a. ($D = 1.19$), Chloroform p.a.

Alle Reagentien der Fa. Merck, Darmstadt.

Standard:

Lyophilisierte Desoxyribonukleinsäure, reinst, hochpolymer aus Lachssperma (Fa. Serva - Feinbiochemie, Heidelberg).

Eichkurve: (Abbildung 7)

10.0 mg Standard - DNA wurden in 100.0 ml 0.1 n KOH gelöst. Diese Stammlösung mit der Konzentration 100 µg/ml wurde folgendermaßen weiterverdünnt: 5.00, 6.25, 8.33, 10.00 und 12.50 µg/ml.

Durchführung:

In sehr saubere Reagenzgläser wurden 0.5 ml 0.04 % ige Indollösung, die 60 µM $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ enthielt, 0.5 ml konzentrierte HCl und 0.5 ml Analysenlösung gegeben und gut gemischt. Die Reagenzgläser wurden mit Alufolie abgedeckt und die Lösung zehn Minuten im Wasserbad auf 100° C erhitzt. Dann wurden die Proben unter fließendem Wasser auf 20° C abgekühlt und zweimal mit Chloroform gewaschen (d.h. je 2.0 ml Chloroform wurden zur Probe pipettiert, kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert). Man erhielt so eine klare, gelbliche Phase, deren Farbintensität bei 492 nm gegen einen Leerwert (1.0 ml 0.1 n KOH, 0.5 ml Indollösung und 0.5 ml HCl konz.) in 1 cm Glasküvetten gemessen wurde. Bei der angegebenen Verdünnung lag die DNA - Konzentration der Proben zwischen 5 und 10 µg/ml.

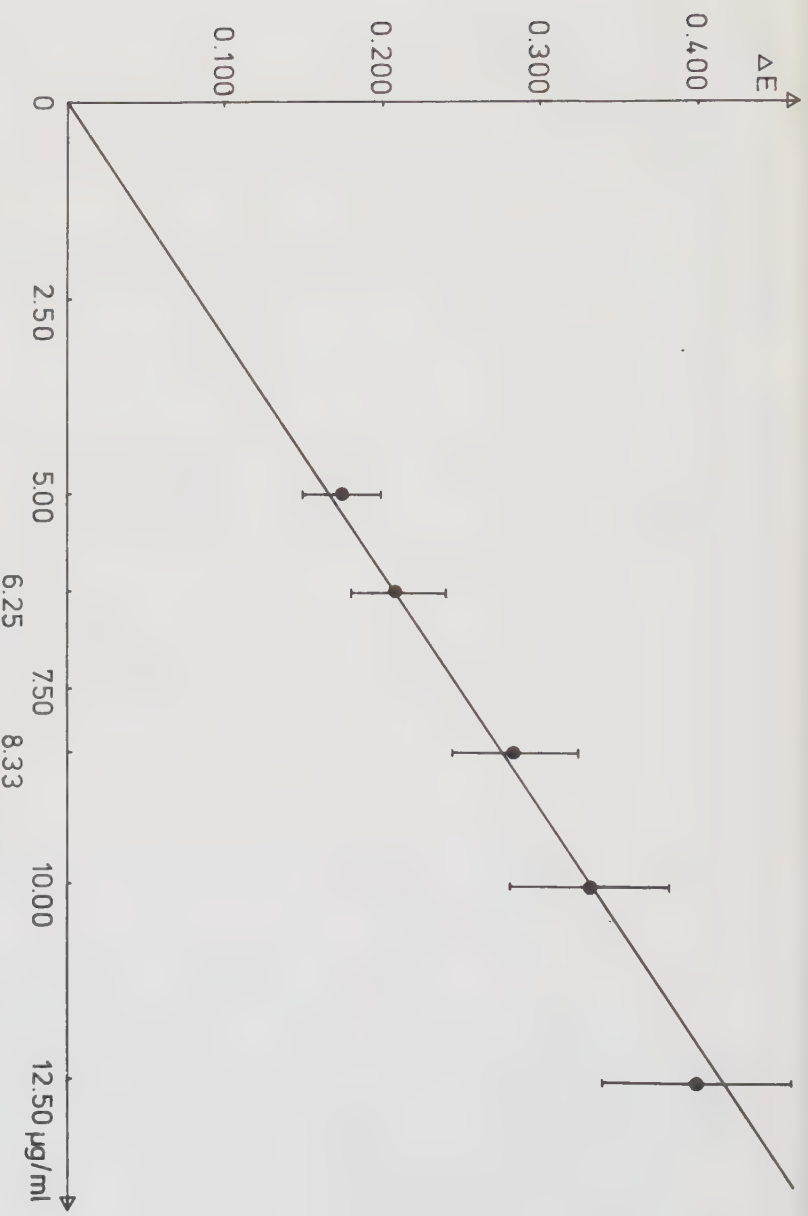


Abbildung 7 DNA - Eichkurve: Beziehung der optischen Empfindlichkeit (Extinktion) E
 zur Konzentration der verwendeten DNA - Eichlösung. Wellenlänge 492 nm;
 Schichtdicke 1 cm; DNA - Standard aus Lachsperma; Leerwert: 1 ml 0.1 n KOH,
 0.5 ml Indolösung, 0.5 ml HCl konz.
 n = 27; Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD.

Berechnung:

(Extinktion Probe / Extinktion Standard) x Konzentration Standard x Verdünnungsfaktor x Volumenfaktor.

Anmerkungen:

- 1) In Abänderung der Originalmethode nach Ceriotti (12) wurde die Indollösung durch Kupfer II Ionen stabilisiert (85).
- 2) In der Originalmethode (12) ist ein umständlicher Prozess zur Reinigung des Chloroforms angeführt. Wir erhielten ein stabilisatorfreies Chloroform durch adsorptive Filtration über Aluminiumhydroxyd - Woelm basisch der Aktivität I nach G. Wohleben (101).
- 3) Von allen drei Proben des ursprünglichen Homogenats wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, so daß sich insgesamt eine Neunfachbestimmung pro Tier ergab.

V. RNA - Bestimmung : Orcin - Methode.

Die Orcin - Reaktion nach Bial (4) auf Pentosen wurde durch Dsche und Schwarz (17) und Mejbaum (70) das erstemal für die RNA - Bestimmung herangezogen. Die Methode basiert auf der Umwandlung von Pentose in Furfural in Gegenwart heißer Säure. Dieses reagiert sodann mit Orcin unter Ausbildung eines grünen Farbkomplexes, wobei Eisenchlorid als Katalysator fungiert (74).

Geräte und Reagentien:

15 ml Glas - Zentrifugengläser, Alufolie, Wasserbad 100° C, Spektralphotometer Zeiss PMQ II, 1 cm Glasküvetten.

Eisen III chlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$) p.a., Salzsäure konz.

(D = 1.19), Orcin krist. ($\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) p.a.

Alle Reagentien der Fa. Merck, Darmstadt.

Standard:

Lyophilisierte Ribonukleinsäure, hochmolekular p.a., $s_{20} \sim 8.0$, aus Hefe (Fa. Serva - Feinbiochemie, Heidelberg).

Eichkurve: (Abbildung 8)

15.0 mg Standard - RNA wurden in 50.0 ml 0.1 n Perchlorsäure gelöst. Diese Stammlösung mit der Konzentration 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wurde nun folgendermaßen weiterverdünnt: 2.00, 5.00, 6.66, 8.33, 10.00 und 16.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Durchführung:

40.0 mg FeCl_3 wurden in 100.0 ml HCl konz. gelöst = Lösung 1. 80.0 mg Orcin wurden kurz vor Gebrauch in 20.0 ml Lösung 1 gemischt = Lösung 2. In saubere Reagenzgläser wurden pipettiert: 0.5 ml Probe, 1.0 ml Lösung 2. Die Gläser wurden für fünfzehn bis zwanzig Minuten im Wasserbad auf 100°C erhitzt und anschließend auf 20°C abgekühlt. Dann folgte die Messung der Farbtintensität bei 670 nm gegen einen Leerwert (0.5 ml 0.1 n Perchlorsäure und 1.0 ml Lösung 2).

Berechnung:

(Extinktion Probe / Extinktion Standard) x Konzentration Standard x Verdünnungsfaktor x Volumenfaktor.

Anmerkung:

Von den drei Proben des ursprünglichen Homogenats wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt, so daß sich eine Neunfachbestimmung pro Tier ergab.

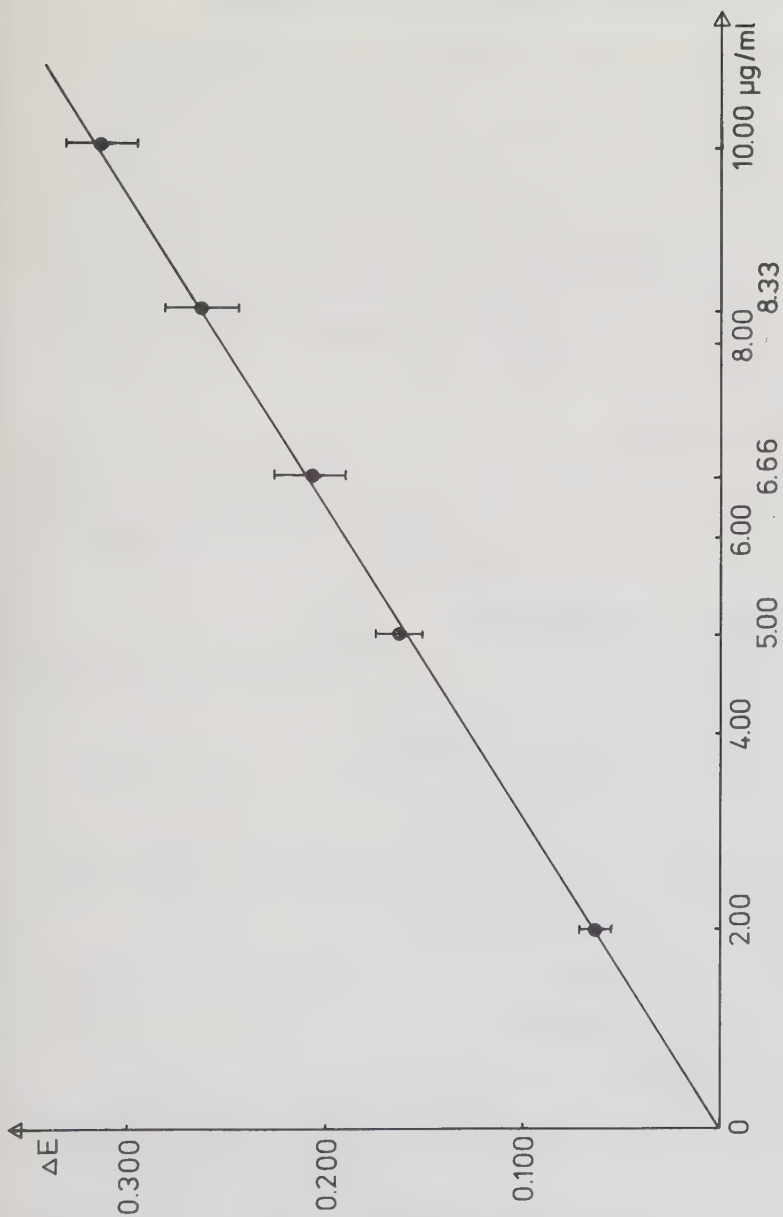


Abbildung 8

RNA - Eichkurve: Beziehung der optischen Empfindlichkeit (Extinktion) E zur Konzentration der verwendeten RNA - Eichlösung. Wellenlänge 670 nm; Schichtdicke 1 cm; RNA - Standard aus Hefe; Leerwert: 0.5 ml 0.1 n perchlorsäure, 1 ml vorbereitete Orcin - Eisen III chlorid - Lösung. n = 24; Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD.

VI. Protein - Bestimmung : Phenol - Folin - Methode.

Die von Lowry et al. (66) modifizierte Methode von Folin - Ciocalteu (26) ist zur Zeit die empfindlichste zur Bestimmung von Eiweißen. Wird Protein mit dem Phenol - Folin - Reagens behandelt, so entsteht ein tiefblauer Farbstoff. Die ausserordentliche Empfindlichkeit der Methode beruht darauf, daß sich zwei Farbreaktionen gleichzeitig abspielen: 1) die Biuret - Reaktion der Peptidbindungen mit Kupfer in alkalischer Lösung und 2) eine Reduktion der Phosphor - Molybdän - Säure und der Wolframsäure durch die im Eiweiß vorkommenden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan (83).

Geräte und Reagentien:

Eppendorf Reaktionsgefäße 3810, Eppendorf Rotationsmischer 3300, Eppendorf Mikroliterpipetten 50 ul, 100 ul und 1000 ul, Eppendorf Photometer 1101 M, 1 cm Glasküvetten.

Folin - Ciocalteu-- Phenolreagens.

Die Normalität der handelsüblichen Lösung wurde durch Titration mit 0.1 n NaOH ermittelt und das Reagens dann so verdünnt, daß eine 1.0 n Lösung erhalten wurde.

Natrium - carbonat - Lösung 2% = Lösung 1

2.0 g Natriumcarbonat (Na_2CO_3) - wasserfrei, p.a. wurden mit Aqua bidest. auf 100.0 ml aufgefüllt.

Kalium - Natrium - tartrat - Lösung 2% = Lösung 2

2.0 g Kaliumnatriumtartrat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$) p.a. wurden mit Aqua bidest. auf 100.0 ml aufgefüllt.

Kupfersulfat - Lösung 1% = Lösung 3

1.0 g Kupfer II sulfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) p.a. wurde mit Aqua bidest. auf 100.0 ml aufgefüllt.

Folin - Gebrauchslösung

0.5 ml Lösung 2 und 0.5 ml Lösung 3 wurden gut gemischt und mit Lösung 1 auf 50.0 ml aufgefüllt. Das Reagens ist nicht haltbar und mußte deshalb immer vor Gebrauch frisch hergestellt werden.

Alle Reagentien der Fa. Merck, Darmstadt.

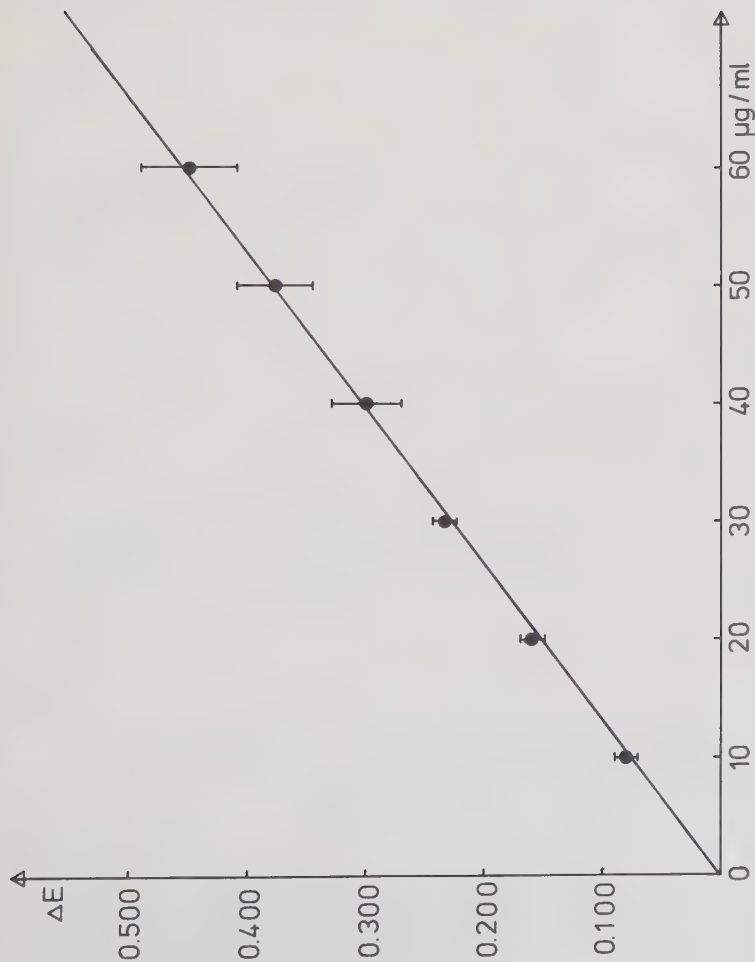


Abbildung 9

Protein - Eichkurve: Beziehung der optischen Empfindlichkeit (Extinktion) E zur Konzentration der verwendeten Protein - Eichlösung. Wellenlänge 578 nm; Schichtdicke 1 cm; Protein - Standard aus Serum - Rinderalbumin; Leerwert: 1.00 ml Folin - Gebrauchslösung, 0.05 ml Aqua bidest., 0.10 ml Phenol - Reagenz n - 21 - 24; Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD.

Standard:

Serum - Albumin vom Rind, trocken, reinst (Fa. Behringwerke AG, Marburg).

Eichkurve: (Abbildung 9)

23.0 mg Standard - Protein wurden in 10.0 ml Aqua bidest. gelöst. Diese Stammlösung mit der Konzentration 2.3 mg/ml wurde dann folgendermaßen weiterverdünnt: 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 und 60.0 µg/ml .

Durchführung:

Pipettier - Ansatz (ml):

	Leerwert	Standard	Analyse
Folin - Gebrauchslösung	1.00	1.00	1.00
Aqua bidest.	0.05	----	----
Standard - Lösung	----	0.05	----
Analysenlösung	----	----	0.05

Gut durchmischen, zehn Minuten warten!

Phenol - Folin - Lösung	0.10	0.10	0.10
-------------------------	------	------	------

Sofort nach Zugabe des Phenol - Folin - Reagenses gut durchmischen, dann dreißig Minuten warten. Anschließend Messung der Farbintensität bei 578 nm gegen den Leerwert in 1 cm Glasküvetten.

Berechnung:

(Extinktion Probe / Extinktion Standard) x Konzentration
Standard x Verdünnungsfaktor x Volumenfaktor.

Anmerkungen:

1) Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte direkt aus dem Gesamthomogenat, das vorher 1 : 10 verdünnt worden war.

2) Vom Homogenat wurden jeweils drei Proben Proteinbestimmung durchgeführt, so daß sich pro Tier eine Dreifachbestimmung ergab.

Statistische Auswertung.

Alle Angaben beziehen sich auf den arithmetischen Mittelwert $\pm$ Standard - Abweichung (SD). Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der t - Test nach Student (18) herangezogen, wobei $p < 0.05$ als statistisch signifikant galt.

Ergebnisse.

I. Klinische Beobachtungen am Gesamttier.

Wie bereits bei vorausgegangenen Untersuchungen beschrieben (62), zeigten die mit PEG gefütterten Tiere einige klinisch auffällige Besonderheiten. Diese wurden jedoch am gegenwärtigen Kollektiv nicht erneut quantifiziert, wohl aber qualitativ bestätigt. So nahmen die PEG - Tiere pro Tag die gleiche Futtermenge wie die Kontrolltiere auf, verzeichneten aber während der 56 Tage langen Versuchsdauer eine geringere Gewichtszunahme. Die Kontrolltiere wogen nach zwei Monaten bei Futteraufnahme ad libitum etwa 90 g , die PEG - Tiere nur etwa 50 g mehr, inklusive des vergrößerten, gefüllten Caecums. Dagegen war die tägliche Trinkmenge erheblich gesteigert: die PEG - Tiere tranken begierig etwa 40 ml pro Tag, gegenüber einer normalen Trinkmenge von 20 ml/die. Dies dürfte durch eine noch nicht näher abgeklärte Polyurie, sowie durch die chronische Diarrhoe erklärt werden, die durch das osmotisch wirksame Polyäthylenglykol bedingt ist. Diese Diarrhoe begann bereits am ersten Versuchstag und dauerte während der ganzen Versuchszeit an. Auch machten die Tiere einen geschwächten Gesamteindruck. Das psychische Verhalten war augenfällig verändert: die Kontrolltiere zeigten Normal- bis Aggressivverhalten, während die PEG - Tiere einen antriebsarmen Eindruck machten. Eine ebenfalls schon beschriebene Dehydrierung, gemessen an einem geringen Anstieg der Serumosmolarität, des Bluthämatokrits, sowie der Serumkonzentration von Natrium und Chlorid (62), konnte schon rein äußerlich beobachtet werden.

II. Makroskopische Beobachtungen am Caecum.

Schon beim Herauspräparieren des Caecums fiel beim PEG - Tier eine starke Vergrößerung des Organs auf (vgl. Abbildung 1). Sein Volumen erreichte nach 56 Versuchstagen das Mehrfache des Ausgangswertes. Auffallend war auch eine deutliche Transparenz der Caecumwände, so daß man den Eindruck hatte, durch die Wand ins Innere des Organs sehen zu können. Beim Eröffnen fand sich

ein breiiger Inhalt mit flüssigem Überstand und beigemischten, offenbar unverdauten Futterresten. Die Kontrolltiere dagegen zeigten keine Transparenz der Caecumwand, die einen eingedickten, sägemehlartigen Inhalt umschloss.

Die Vergrößerung des Caecums machte sich nicht nur durch die Volumenzunahme, sondern auch durch eine Oberflächenvergrößerung und einen Gewichtsanstieg des Gesamtorgans bemerkbar (62). Zur Dokumentation der Massenzunahme auch der isolierten Schleimhaut wurde in den gegenwärtigen Versuchen das Feucht- und Trockengewicht bestimmt.

III. Feuchtgewicht, Trockengewicht und Wassergehalt der isolierten Caecummucosa.

Das Feuchtgewicht der Mucosa verhielt sich bei den Kontrolltieren sehr einheitlich. Innerhalb der jeweils drei Tiere umfassen den Gruppen ergab sich keine Zeitabhängigkeit. Die Einzelwerte für das Mucosafeuchtgewicht streuten zwischen 274 mg und 498 mg und waren untereinander zu keinem Zeitpunkt signifikant verschieden (Abbildung 10).

Bei den 4 bis 9 Tieren pro Gruppe, die 2 bis 56 Tage lang mit PEG gefüttert worden waren, zeigten sich aber erhebliche Unterschiede. Bereits am vierten Tag der Fütterung war das Mucosafeuchtgewicht dieser Tiere signifikant ($p < 0.005$) gegenüber dem Mittelwert aller Kontrolltiere erhöht. Wie Abbildung 10 zeigt, steigt die Kurve des Mucosafeuchtgewichts der PEG - behandelten Tiere innerhalb der ersten 14 Tage rasch an, um dann in einen etwas abgeflachteren Verlauf überzugehen. Bei Versuchsende war eine annähernde Verdopplung des Schleimhautfeuchtgewichtes erreicht.

Dieses Ergebnis war insofern überraschend, als in früheren Experimenten (62), in denen mit dem Trockengewicht des gesamten Caecums gearbeitet worden war, das Gewicht im Gegensatz zu den jetzigen Befunden erst nach 14 Tagen signifikant erhöht, dafür aber während der zwei Monate zeitlinear angestiegen war. Daraus ergab sich die Frage, ob die aufgetretenen Differenzen

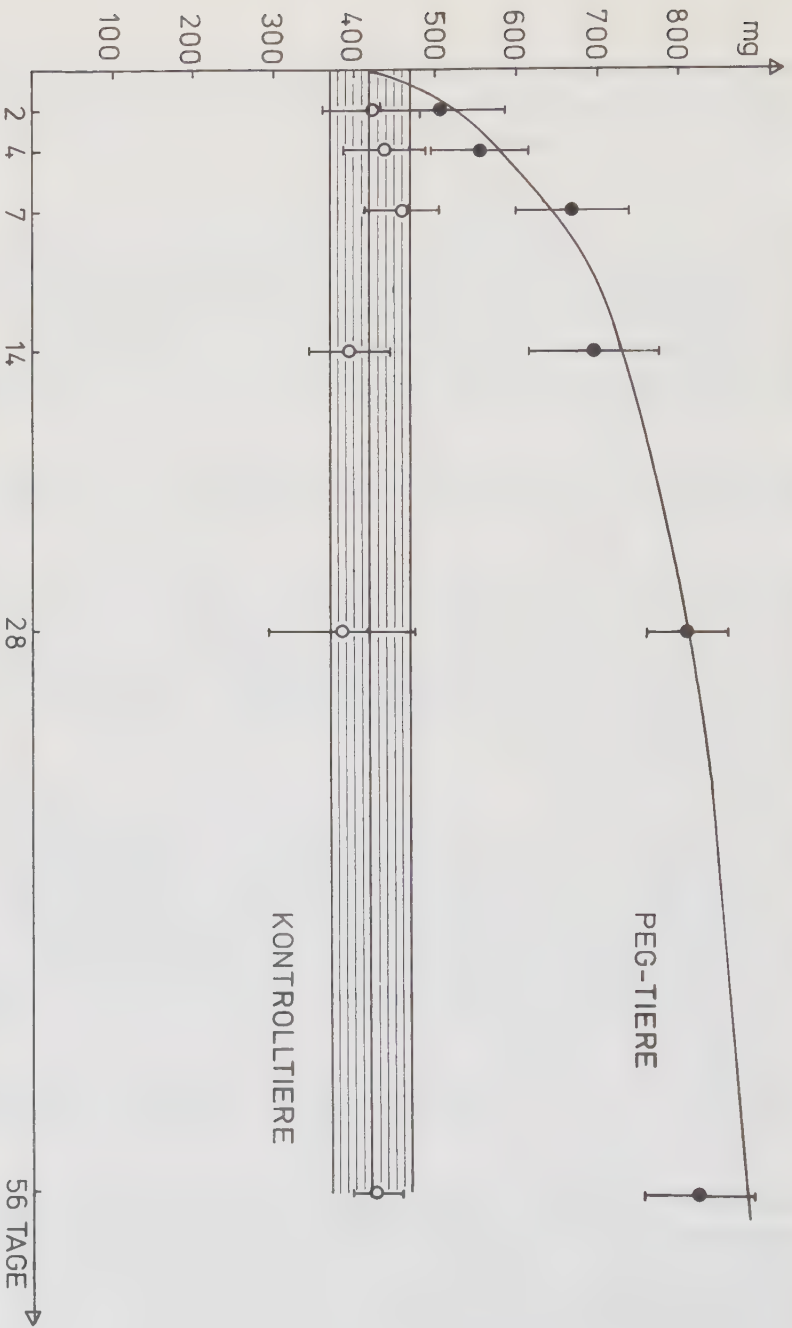


Abbildung 10

Feuchtgewicht der isolierten Caecum - Mucosa (Ordinate) von Kontrollratten (○) und mit Polyäthylenglykol gefütterten Ratten (●) in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung (Abszisse). Arithmetische Mittelwerte + SD für je 3 Kontrolltiere und je 4 bis 9 PEG - behandelte Tiere. Der schraffierte Bereich zeigt den arithmetischen Gesamtmittelwert aller Kontrolltiere + SD.

etwa durch den Wassergehalt des Organs zu erklären wären. Wir führten daher eine ergänzende Versuchsreihe durch, in der wir in zwei neuen Tierkollektiven jeweils das Feucht- und Trockengewicht der Caecum - Mucosa bestimmten. Aus diesen Werten ließ sich der Wassergehalt der Mucosa einfach berechnen (Tabelle I). Man sieht, daß die Schleimhaut aller mit PEG gefütterten Tiere einen im Durchschnitt etwa 6 % höheren Wassergehalt aufweist, als die der Kontrolltiere. Die Zunahme des Wassergehaltes ist bereits nach 4 Tagen signifikant, zwischen dem 7. und 14. Tag jedoch am ausgeprägtesten. Nach 4 bzw. 8 wöchiger PEG - Behandlung nahm der Wassergehalt wieder etwas ab, blieb aber erhöht. Abbildung 11 zeigt die Zunahme des Feucht- und Trockengewichtes der Mucosa in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung im gleichen Kollektiv.

Ähnlich wie bei Loeschke et al. (62) steigt das Trockengewicht mit der Zeit an, wobei nach 56 Versuchstagen ein annähernde Verdopplung erreicht ist. Dort verwendete man, wie schon früher erwähnt, jedoch das gesamte Caecum, so daß die absoluten Werte bei uns um zirka 50 % niedriger liegen. Auch die isolierte Mucosa zeigt erst spät (erstmals am 28. Versuchstag) ein signifikant höheres Trockengewicht ($p < 0.005$).

Die Mucosafeuchtgewichtskurve der PEG gefütterten Tiere nimmt in etwa denselben Verlauf wie in Abbildung 10, wenn auch die Absolutwerte in diesem kleinen Kollektiv etwas niedriger sind. Erneut läßt sich ein zweiphasischer Kurvenverlauf feststellen: ein rascher Anstieg während der ersten 7 Versuchstage und anschließende Abflachung bis zum Ende des Versuchs. Die Steilheit der Zunahme des Feucht- und Trockengewichts zwischen dem 7. und dem 56. Tag ist annähernd die gleiche.

Aus dem raschen Ansteigen des Mucosafeuchtgewichts innerhalb der ersten Woche läßt sich schließen, daß die Gewichtszunahme der Mucosa in diesem Zeitraum zu einem großen Teil durch Wasseraufnahme bedingt ist, d.h. die Schleimhaut schwillt. Zusätzlich stellt sich jedoch eine echte Gewichtszunahme ein, die offenbar durch Vermehrung von organischem Zellmaterial bedingt ist.

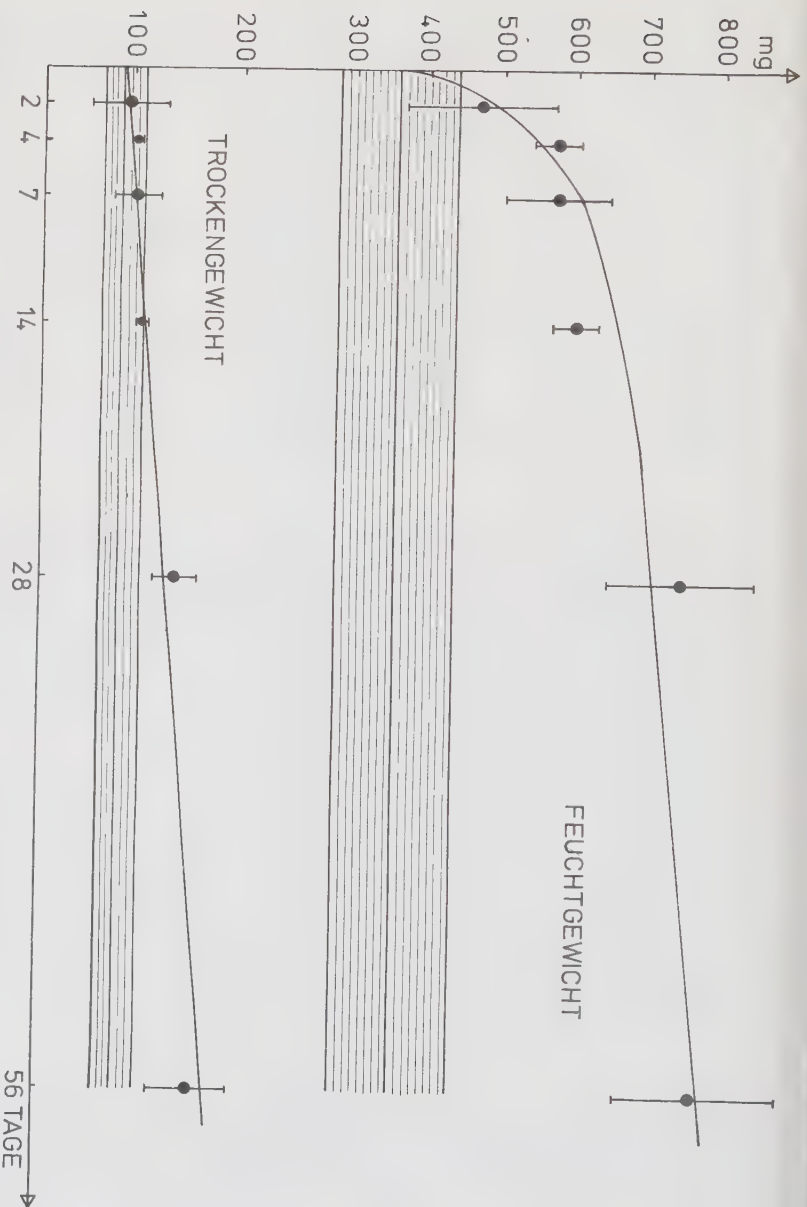


Abbildung 11

Feuchtgewicht (oben) und Trockengewicht (unten) der isolierten Caecum - Mucosa (Ordinate) bei Kontrollratten (schraffierte Bereiche) und mit Polyäthylenglykol gefütterten Ratten (●) in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung (Abszisse) . Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD für 5 Kontrolltiere und je 3 bis 7 PEG - Tiere.

Tabelle I : Feuchtgewicht, Trockengewicht und Wassergehalt der isolierten Caecum - Mucosa von Ratten in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung mit Polyäthylenglykol (PEG).

	Anzahl	Mucosafeucht- gewicht (mg)	Mucosatrocken- gewicht (mg)	Wassergehalt %	Zunahme des Wassergehalts %
Kontrollen	5	358.7 ±	88.3 ± 20.1	75.1 ± 5.2	
PEG 2 Tage	6	470.8 ±	96.1 ± 35.5	80.1 ± 3.6	5.0
4 Tage	6	573.7 ±	101.8 ± 5.4	82.2 ± 1.8 +	7.1
7 Tage	3	574.1 ±	102.1 ± 11.8	82.2 ± 1.1 +	7.1
14 Tage	3	602.6 ±	109.3 ± 4.4	81.9 ± 0.6 +	6.8
28 Tage	3	749.1 ±	143.5 ± 18.9 ++	80.8 ± 0.7 +	5.7
56 Tage	7	773.3 ±	160.6 ± 35.8 ++	79.3 ± 2.7	4.2

" Arithmetische Mittelwerte ± SD

+ p < 0.05, verglichen mit dem Kontrolltierkollektiv

++ p < 0.005

IV. Bestimmung der Nukleinsäuren DNA und RNA, sowie des Proteins in der isolierten Caecum - Mucosa.

Diese nicht durch Wasser bedingte Gewichtszunahme muß durch eine Vergrößerung der Einzelzellen (Hypertrophie) oder eine Vermehrung der Zellzahl (Hyperplasie) bedingt sein. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, führten wir eine Bestimmung der Nukleinsäuren DNA und RNA, sowie eine Bestimmung des Proteingehaltes der Zellen durch.

A) Mengen von DNA, RNA und Protein.

Tabelle II und Abbildung 12 geben die M e n g e n der DNA, RNA und des Proteins bei Kontrolltieren und PEG gefütterten Tieren wieder. Die Werte für das Mucosafeuchtwicht des Hauptkollektivs sind hier tabellarisch aufgeführt, um die Originaldaten für die später nur noch graphisch dargestellten Konzentrationen von DNA, RNA und Protein pro 100 mg Feuchtwicht zu liefern.

Aus Abbildung 12 geht hervor, daß die Menge von DNA, RNA und auch Protein in den ersten 14 Tagen rasch und später langsamer zunimmt. Dieser Anstieg ist erstmals signifikant für die DNA - Menge nach zwei Tagen ($p < 0.005$), für die RNA - Menge nach ebenfalls zwei Tagen ($p < 0.05$) und für die Proteinmenge erst nach vier Tagen ($p < 0.005$). Der Zeitverlauf für die Zunahme aller drei Substanzen entspricht in etwa der Zunahme des Feuchtwichts.

Die Kontrolltiere zeigten während des ganzen Versuchs keine Änderungen ihrer DNA-, RNA- und Proteinmengen (vgl. Abb. 12), so daß diese Werte in Tabelle II zusammengefaßt wurden.

Tabelle II : Feuchtgewicht und Mengen von DNA, RNA und Protein in der isolierten Caecum - Mucosa von Ratten in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung mit Polyäthylenglykol (PEG).

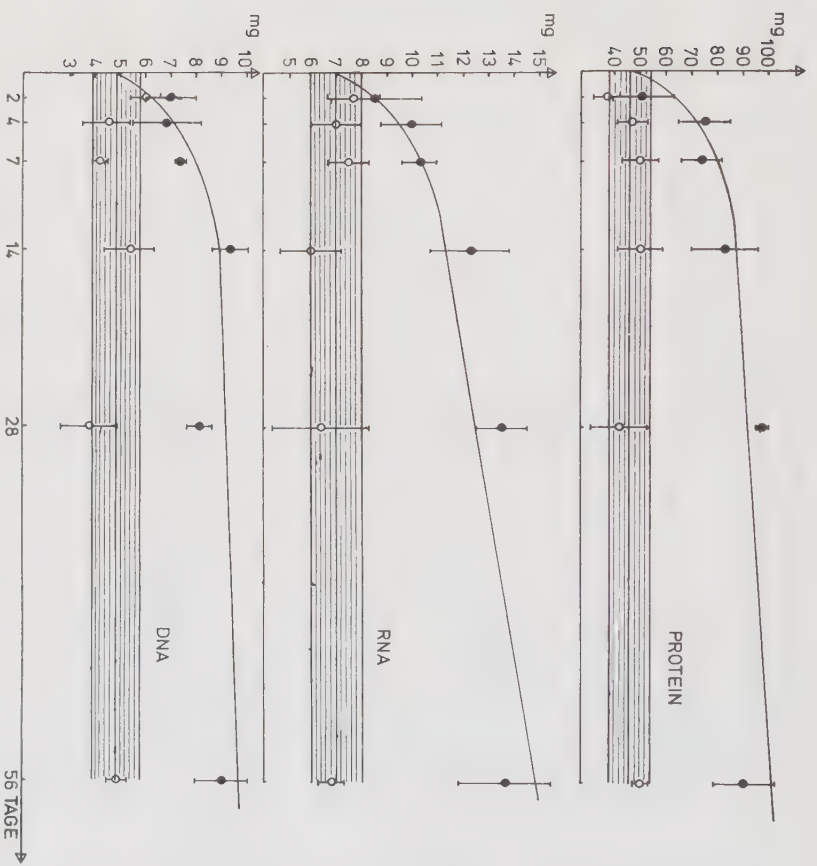
	Anzahl	Mucosafeucht- gewicht (mg)	DNA	Mengen (mg) RNA	Protein
Kontrollen	18	420.7 $\pm$ 57.6 "	4.8 $\pm$ 1.0	6.9 $\pm$ 1.2	46.1 $\pm$ 8.0
PEG 2 Tage	5	505.9 $\pm$ 83.6	7.0 $\pm$ 1.0 ++	8.6 $\pm$ 1.8 +	50.8 $\pm$ 11.9
4 Tage	4	556.3 $\pm$ 61.0 ++	6.9 $\pm$ 1.4 ++	10.0 $\pm$ 1.2 ++	74.6 $\pm$ 9.9 ++
7 Tage	5	668.0 $\pm$ 68.2 ++	7.4 $\pm$ 0.2 ++	10.4 $\pm$ 0.7 ++	74.2 $\pm$ 7.6 ++
14 Tage	5	695.5 $\pm$ 78.9 ++	9.4 $\pm$ 0.7 ++	12.3 $\pm$ 1.5 ++	83.4 $\pm$ 13.2 ++
28 Tage	5	811.2 $\pm$ 51.8 ++	8.2 $\pm$ 0.5 ++	13.5 $\pm$ 1.0 ++	98.2 $\pm$ 1.9 ++
56 Tage	9	825.6 $\pm$ 67.4 ++	9.1 $\pm$ 1.0 ++	13.6 $\pm$ 1.8 ++	90.9 $\pm$ 11.8 ++

" Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD

+ p < 0.05, verglichen mit dem Kontrolltierkollektiv

++ p < 0.005

Abbildung 12



Mengen an DNA (unten), RNA (Mitte) und Protein (oben) der isolierten Caecum - Mucosa bei Kontrolltieren (o) und mit Polyäthylenglykol gefütterten Ratten (●) (Ordinate) in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung (Abszisse). Arithmetische Mittelwerte + SD für je 3 Kontrolltiere und je 4 bis 9 PEG - behandelte Tiere. Der schraffierte Bereich zeigt den arithmetischen Gesamtmittelwert aller Kontrolltiere + SD.

B) Prozentuale Änderungen von DNA, RNA und Protein.

Abbildung 13 veranschaulicht die p r o z e n t u a l e Zunahme der DNA-, RNA- und Proteinmenge im Vergleich zu den als 100 % gesetzten Werten der Kontrolltiere. Am Ende der zweimonatigen Fütterungszeit haben alle untersuchten Parameter um etwa 100 % zugenommen (vgl. Tab. II). Dies entspricht quantitativ der Verdopplung des Mucosafeucht- und -trockengewichts zu diesem Zeitpunkt.

C) Konzentrationen von DNA, RNA und Protein pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht.

In Abbildung 14 sind die K o n z e n t r a t i o n e n von DNA, RNA und Protein pro 100 mg Mucosafeuchtgewicht bei Kontrolltieren und PEG - behandelten Tieren in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung aufgetragen. Man sieht, daß alle errechneten Konzentrationen für DNA, RNA und Protein pro 100 mg Feuchtgewicht (mit Ausnahme der Proteinkonzentration für den 4. Versuchstag) im SD - Bereich der Kontrolltiere liegen. Alle Werte sind von den Kontrollen nicht signifikant verschieden ($p > 0.05$).

D) Quotienten von DNA, RNA und Protein zueinander.

Die Q u o t i e n t e n der DNA-, RNA- und Proteinmengen zueinander sind deshalb besonders aussagekräftig, weil weder der Wassergehalt der Mucosa noch Fehler bei der nur semiquantitativen Schleimhautisolierung oder beim Homogenisierungsprozess in sie eingehen.

Wie Abbildung 15 wiedergibt, liegen auch hier alle Werte für die einzelnen Quotienten der untersuchten Parameter im Streubereich der Kontrolltiere und sind von diesen nicht signifikant verschieden. Eine Ausnahme bildet der erniedrigte Quotient

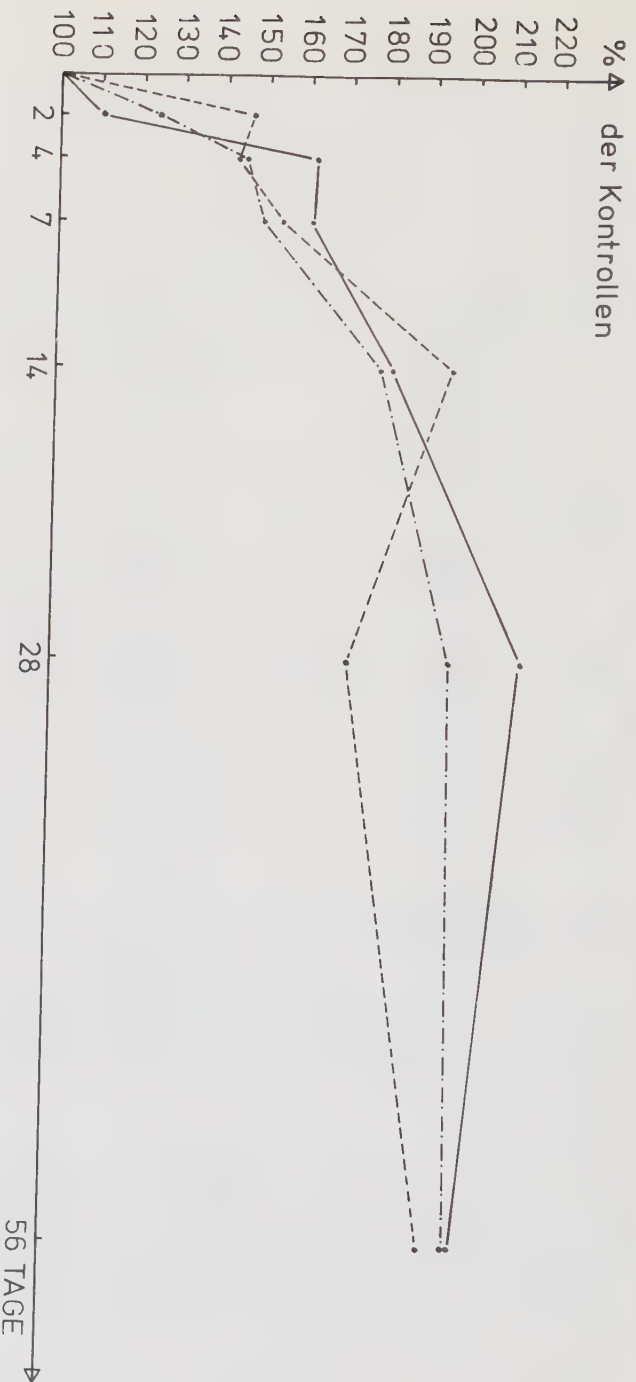


Abbildung 13

Prozentuale Zunahme (Ordinate) der DNA-, RNA- und Proteinnengen der isolierten Caecum - Mucosa von Ratten in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung mit Polyäthylenglykol (Abszisse). Die Mittelwerte des Kontrollkollektivs wurden einheitlich = 100 % gesetzt. Arithmetische Mittelwerte von 18 Kontrolltieren und 4 bis 9 PEG - Tieren.

-----DNA; -.-.-.-.- RNA; — Protein.

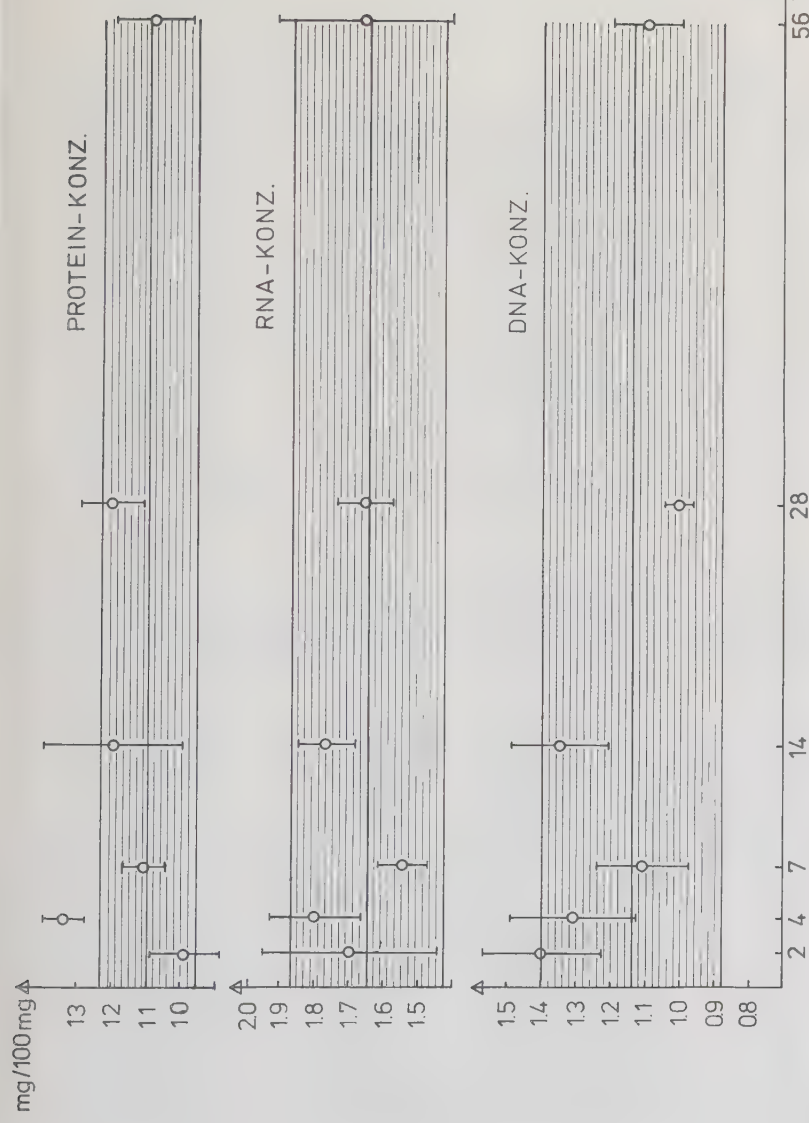


Abbildung 14

Konzentrationen von DNA (unten), RNA (Mitte) und Protein (oben) pro 100 mg Feuchtgewicht der isolierten Caecum - Mucosa von Kontrollratten (schraffierter Bereich) und mit Polyäthylenglykol behandelten Ratten (o) (Ordinate) in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung (Abszisse). Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD für 18 Kontrolltiere (schraffierter Bereich) und 4 bis 9 PEG - Tiere.

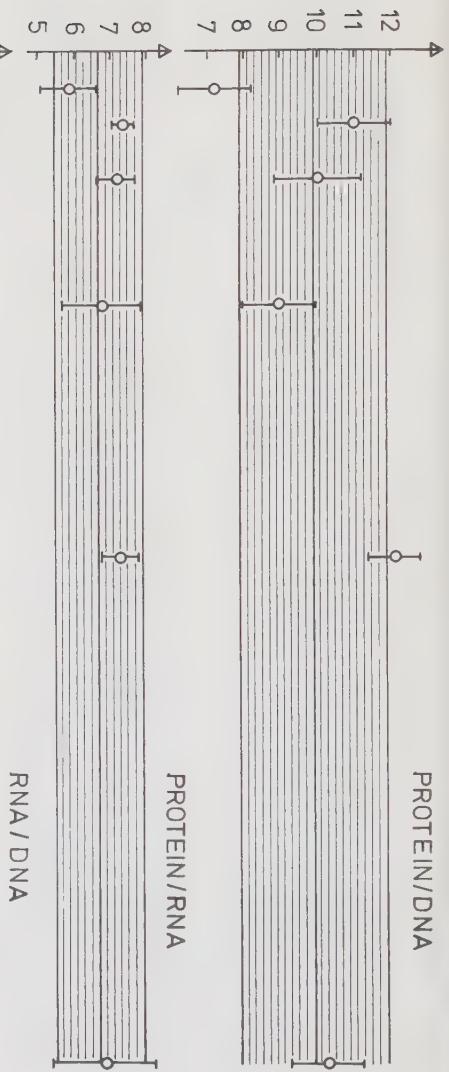


Abbildung 15

Quotienten von RNA/DNA (unten), Protein/RNA (Mitte) und Protein/DNA (oben) der isolierten Caecum - Mucosa von Kontrollratten (schraffierter Bereich) und mit Polyäthylenglykol gefütterten Ratten (o) (Ordinate) in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung (Abszisse). Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD für 18 Kontrolltiere (schraffierter Bereich) und je 4 bis 9 PEG - Tiere.

Protein / DNA der zwei Tage mit PEG behandelten Tiere
($p < 0.05$).

E) Schlußfolgerungen.

Aus den bisherigen Ergebnissen lassen sich zwei Folgerungen ableiten. Aus der Zunahme des Trockengewichts zusammen mit dem Anstieg der Nukleinsäure- und Proteinmengen folgt, daß durch PEG - Fütterung eine Steigerung der Nukleinsäure- und Proteinsynthese in der Mucosa des Caecums ausgelöst wurde. Andererseits zeigt die Konstanz der Konzentrationen und der Quotienten, daß die Zellen nach zweimonatiger Fütterung die gleiche Zusammensetzung bezüglich ihres DNA-, RNA- und Proteingehaltes aufwiesen. Die Zellen müssen sich also multipliziert haben und sind nicht etwa durch einen vermehrten Proteineinbau pro Zelle größer geworden.

Es liegt also eindeutig eine zelluläre *H y p e r p l a s i e* vor.

V. Bestimmung von DNA, RNA und Protein in abgeschabten Epithelzellen der Mucosa, sowie im nach Abschabung verbliebenen Schleimhautrest.

Infolge der verwendeten Technik der Mucosa - Isolierung wurden die Lamina propria mucosae, die Lamina muscularis mucosae und variable Anteile der Tela submucosa mit abgetrennt. Um einen Einfluß dieser bindegewebigen und muskulären Elemente auf die Ergebnisse auszuschließen, untersuchten wir bei vier Kontrolltieren und bei vier Tieren, die sieben Tage PEG - Lösung getrunken hatten, eine, durch oberflächliche Abschabung gewonnene (vgl. Abb. 6), Epithelzellfraktion.

Abbildung 16 zeigt den Anteil des Feuchtgewichts, der DNA, RNA und des Proteins, den die abgeschabten Zellen im Vergleich zu dem nach Abschabung verbliebenen Schleimhautrest ausmachen. Dieser Anteil ist als Prozentsatz der (aus den jeweiligen Summen berechneten) Werte für die Gesamtmucosa angegeben. Man sieht, daß der prozentuelle Anteil der abgeschabten Zellen am Feuchtgewicht, an der DNA, der RNA und am Protein in beiden Tiergrup-

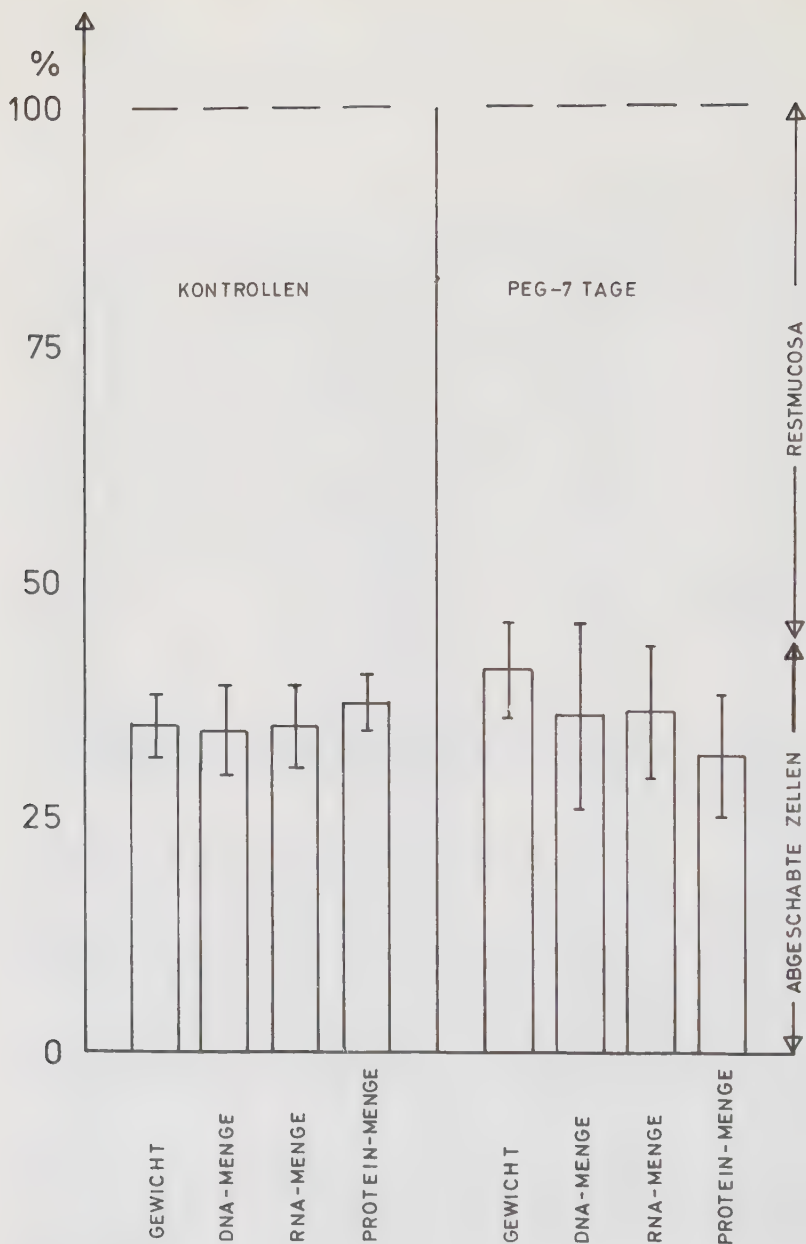


Abbildung 16

Prozentuelle Anteile des Feuchtgewichtes sowie der Mengen von DNA, RNA und Protein in abgeschabten Mucosaepithelzellen (unten) und im nach Abschabung verbliebenen Schleimhautrest (oben) des Caecums von Kontrollratten (links) sowie Ratten nach 7 tägiger Fütterung mit Polyäthylenglykol (rechts). Arithmetische Mittelwerte + SD für jeweils 4 Kontroll- und PEG - Tiere.

pen bei etwa 35 % (31 bis 40 %) liegt. Bei etwas größerer Streuung im PEG - Kollektiv lassen sich statistisch signifikante Unterschiede weder für die jeweiligen Parameter i n n e r - h a l b einer Tiergruppe noch z w i s c h e n den beiden Kollektiven sichern. Daraus kann geschlossen werden, daß die Zellen die gleiche prozentuale Zusammensetzung an DNA, RNA und Protein aufweisen, wie die Gesamtmucosa.

VI. Prüfung der Reversibilität.

Um zu prüfen, ob der Vorgang der Massenzunahme der Mucosa nach Absetzen der PEG - Lösung wieder rückläufig war, wurden vier Tiere 28 Tage lang mit PEG - Lösung versorgt und anschließend für weitere 28 Tage wieder auf Frischwasser gesetzt. In Tabelle III ist das Ergebnis dieses Versuchs mit den entsprechenden Werten von Tieren verglichen, die 56 bzw. 28 Tage lang mit PEG versorgt wurden, sowie mit den Werten der Kontrolltiere aus dem Hauptkollektiv.

Die Werte für das Mucosafeuchtgewicht und die Proteinmenge waren gegenüber den Kontrolltieren noch etwas erhöht, im Vergleich zu den nur mit PEG - behandelten Tieren aber bereits deutlich rückläufig. Etwas überraschend war der Befund, daß die DNA- und die RNA - Mengen zwar ebenfalls eine Tendenz zur Rückbildung zeigten, daß dies jedoch eindeutig langsamer der Fall war.

Der Prozess der Mucosahyperplasie war also nach Absetzen der PEG - Lösung reversibel, die völlige Rückbildung aber nach vier Wochen noch nicht abgeschlossen.

Tabelle III : Feuchtgewicht sowie Mengen von DNA, RNA und Protein in der isolierten Caecum - Mucosa von Ratten nach verschiedenen langer Fütterung mit Polyäthylenglykol (PEG).

Anzahl	Mucosafeucht- gewicht (mg)	DNA	Mengen (mg) RNA	Protein
PEG 56 Tage	9 825.6 $\pm$ 67.4 "	9.1 $\pm$ 1.0	13.6 $\pm$ 1.8	90.9 $\pm$ 11.8
PEG 28 Tage	5 811.2 $\pm$ 51.8	8.2 $\pm$ 0.5	13.5 $\pm$ 1.0	98.2 $\pm$ 11.9
PEG 28 Tage + H ₂ O 28 Tage	4 664.4 $\pm$ 71.5	8.2 $\pm$ 0.2	13.1 $\pm$ 0.7	61.9 $\pm$ 6.8
Kontrollen (stets H ₂ O)	18 420.8 $\pm$ 57.6	4.8 $\pm$ 1.0	6.9 $\pm$ 1.2	46.1 $\pm$ 8.0

" Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SD

Diskussion.

A) Besprechung der angewendeten Methodik.

Tiermaterial, Unterbringung, Fütterung und Trinkversorgung.

Um für die Versuche ein einheitliches Tierkollektiv zur Verfügung zu haben, fanden ausschließlich gleichgeschlechtliche, erwachsene (150 bis 250 g) SPF - Ratten des gleichen Wistar - Stammes derselben Lieferfirma Verwendung. Nach dem Versand wurde es den Tieren ermöglicht, sich zunächst von den Anstrengungen des Transports zu erholen und sich dann an die im Bezug auf Käfiggröße, Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit für die Ratte optimalen Bedingungen (2) unseres Tierstalls anzupassen. Das Futter, das die Tiere ad libitum aufnahmen, enthielt alle für die Ratte essentiellen Rohnnährstoffe, Mineralstoffe, Aminosäuren, Spurenelemente und Vitamine in geeigneter Zusammensetzung. Die Verwendung großvolumiger Tränkflaschen garantierte eine stets ausreichende Flüssigkeitsversorgung, was bei der experimentellen Tiergruppe - die ja sehr große Mengen der PEG - Lösung aufnahm - besonders wichtig war, und durch tägliche Kontrollen im Tierstall überwacht wurde. Indem wir alle Tiere gleichzeitig in den Versuch nahmen, versuchten wir, mögliche biologische Schwankungen während der langen Versuchsdauer zu vermeiden oder doch so gering wie möglich zu gestalten. Da biologische Vorgänge periodisch ablaufen und die endogene Periodizität mit den Rhythmen der Umwelt synchronisiert ist, mußte auf die circadianen Schwankungen der DNA-, RNA- und Proteinsynthese (45,56) geachtet werden. Wir versuchten, durch eine Reihe von Maßnahmen diese Erscheinung zu berücksichtigen. Da wir aber ein lebendes Tierkollektiv und keine Gewebekultur vor uns hatten, war dies nur in einem gewissen Rahmen möglich. So unterwarfen wir die Tiere einem kontinuierlichen Tag - Nacht - Rhythmus und verzichteten, um sie möglichst ungestört zu lassen, auf Zwangsfütterungen. Ein um wenige Stunden verschobener Trinkbeginn konnte bei der einzelnen Ratte nicht ausgeschlossen werden, weshalb auch die ersten Untersuchungen erst nach zwei Tagen sinnvoll erschienen. Schließlich legten wir den Zeitpunkt des Tötens der Tiere auf eine bestimmte Tageszeit fest.

Präparation.

Die Abtrennung der Mucosa des Caecums bereitete kaum Schwierigkeiten. Da die Lamina muscularis mucosae eine natürliche Grenze zur darunterliegenden Schicht der Tela submucosa bildet, war es sehr leicht möglich, die gesamte erkennbare Schleimhaut, meistens sogar in einem zwar zerrissenen, aber doch zusammenhängenden Stück abzutragen. Die beim Ausbreiten des Organs auf Filterpapier auftretende Faltenbildung wurde durch Einschnitte vom Rand her oder durch Glattziehen mit der Pinzette ausgeglichen. Die angefertigten histologischen Schnitte (vgl. Abb. 3 bis 6) erbringen den Beweis für die praktische Durchführbarkeit unserer Abtrennungstechnik. Allerdings ist damit zu rechnen, daß manchmal auch variable Anteile der tiefer liegenden Submucosa mit abgetrennt wurden und in die Weiterverarbeitung mit eingingen. Die Isolierung der Schleimhaut ist deshalb nur semiquantitativ möglich, wir schätzen jedoch, etwa 95 % reine Mucosa zu erfassen.

Extraktion der Nukleinsäuren aus dem Zellhomogenat und ihre Bestimmung in den erhaltenen Auszügen.

Von den verschiedenen in der Literatur beschriebenen Methoden der quantitativen Analyse von Nukleinsäuren (37,74,75) werden am häufigsten die Verfahren von Schneider (92), Schmidt - Thannhauser (91) sowie Ogur und Rosen (80) herangezogen. Letzteres (80) eignet sich besonders zur Aufarbeitung pflanzlichen Materials. Von allen Verfahren stehen inzwischen zahlreiche Variationen mit technischen Verbesserungen zur Verfügung.

Bevor spezifische Methoden zur Nukleinsäurebestimmung angewendet werden, ist es allgemein notwendig, das Gewebe einigen Vorbereitungen zu unterziehen, um Bestandteile daraus zu entfernen, welche die Bestimmung stören könnten. Erst danach können die Nukleinsäuren in teilweise gereinigtem Zustand aus dem Gewebe extrahiert und anschließend bestimmt werden. In allen drei o.a. Verfahren besteht deshalb der erste Schritt der Analyse in der Entfernung von Gewebebestandteilen niederen Molekulargewichts (u.a. freie Nukleotide, anorganisches und organisches Phosphat, einfache Saccharide) und Fetten durch Zugabe

von kalter Säure zum Homogenat. Verschiedene Polyphosphate und Glykogen sind davon nicht betroffen. Bei der Methode nach Schmidt - Thannhauser wird der Gewebsrest sodann in Alkali gelöst, welches die darin befindliche RNA in eine Form bringt, die später nicht mehr durch Säure ausgefällt werden kann. Folglich läßt sich die RNA von der DNA trennen, indem man die Lösung ansäuert und so die DNA und das Protein ausfällt. Im Verfahren nach Schneider wird heiße Säure (Trichloressigsäure oder Perchlorsäure) verwendet, um beide Nukleinsäuren aus dem Homogenat zu extrahieren, wobei das Gewebeprotein als unlöslicher Rest verbleibt. In der Bestimmung nach Ogur und Rosen schließlich wird die RNA mit kalter Perchlorsäure geeigneter Stärke extrahiert und die DNA später durch heiße Säure entfernt. Der letzte Schritt in allen drei Methoden besteht in der Ermittlung der Menge von DNA und RNA im Extrakt. Da Nukleinsäuren drei verschiedene chemische Komponenten, nämlich Purin- und Pyrimidinbasen, Ribose oder Desoxyribose und Phosphor, enthalten, können quantitative Analysen auf der UV - Absorption der Basen, auf spezifischen Reaktionen für die Pentosen oder auf der Bestimmung des Phosphors im Extrakt beruhen. Methoden, die auf der UV - Absorption oder der Phosphorkonzentration basieren, unterscheiden nicht zwischen RNA und DNA und können deshalb nur dort angewendet werden, wo die beiden Nukleinsäuren zuerst getrennt worden waren, wie in der Schmidt - Thannhauser - und der Ogur - Rosen - Methode. Andererseits erlauben es die spezifischen Farbreaktionen für Ribose und Desoxyribose, RNA und DNA unabhängig voneinander in der gleichen Lösung zu bestimmen, z.B. in der Schneider - Methode.

Wir entschlossen uns zur Nukleinsäureanalyse nach Schmidt - Thannhauser, denn sie liefert die beste theoretische und praktische Basis zu einer präzisen Bestimmung (74). Von den verschiedenen Formen des Verfahrens wählten wir aus Gründen der technisch einfachen Durchführbarkeit die Modifikation nach Fleck und Begg (24,74,75). Die dort empfohlenen Vorkehrungen zur Fehlervermeidung bei der Analyse (Enzymdenaturierung, inkomplette Ausfällung und Hydrolyse von RNA und DNA sowie Ungenauigkeiten der Normalitäten der verwendeten Säuren, der Inku-

bationszeit und -temperatur) wurden getroffen. Nur die angegebenen Volumina wurden aus praktischen Gründen maßstabsgerecht geändert, nachdem in Vorversuchen festgestellt worden war, daß dadurch am Endergebnis nichts verfälscht wird.

Für die quantitativen Bestimmungen der Nukleinsäuren in den verbliebenen Extrakten mußten wir colorimetrische Verfahren heranziehen, da in unseren Laboratorien keine Möglichkeit bestand, UV - Absorptionsmessungen durchzuführen.

Der DNA - Gehalt läßt sich durch Reaktion der Desoxyribose mit Diphenylamin, Indol, Cystein oder Tryptophan ermitteln. Wir wählten die bewährte Methode mit Indol nach Ceriotti (12), die präzise, empfindlich und relativ frei von Interferenzen ist (86). Statt stabilisatorfreies Chloroform auf die umständliche, veraltete Art zu gewinnen, wie es in der Originalmethode beschrieben ist, verwendeten wir das Reinigungsverfahren nach Wohlleben (101). Auch wurde die Indollösung durch Zusatz von Kupfer II Ionen stabilisiert (85). Die im Extrakt mitenthaltene Proteinmenge verursacht keine Interferenz mit der Indol - Pentose - Reaktion (86).

Für die Bestimmung des RNA - Gehältes gibt es ebenfalls verschiedene Farbreaktionen der Ribose z.B. mit Phloroglucinol, Anilin, p - Bromanilin und Orcin. Wir verwendeten die am meisten empfohlene Methode mit Orcin (41,74), die allerdings zu Interferenzen mit einigen Stoffen neigt, wie z.B. mit Hexosen, Heptosen, Polysacchariden sowie großen Mengen von Protein und Phosphaten. Für unsere Zwecke war sie jedoch durchaus brauchbar, da wir ja vor Beginn der Nukleinsäureextraktion aus dem Gewebe Zucker und Phosphate durch Säurefällung entfernt hatten und das Protein sich am Ende der Analyse im DNA - Extrakt befand. Das nicht entfernte Glykogen und andere Polysaccharide störten die Bestimmung vermutlich auch nicht. Im Fall des Glykogens wurden Interferenzen beim Lebergewebe beschrieben (74), dessen Glykogengehalt aber sehr viel höher liegt als der des Darms, welcher nur 0.04 % des Feuchtgewichts (= 2.5 % des RNA

- Anteils) beträgt (1). Interferenzen mit anderen Polysacchariden wurden bisher nur bei Pflanzen mit ihrem extrem hohen Zellulosegehalt festgestellt (74).

Den Proteingehalt der Mucosazellen bestimmten wir direkt aus dem Homogenat mit der zwar störemfindlichen, zur Zeit aber doch gebräuchlichsten Methode nach Folin - Ciocalteu (26), modifiziert nach Lowry et al. (66). Bei diesem Verfahren werden neben den Eiweißen und Peptiden auch Tryptophan, Tyrosin, Phenol, Harnsäure, Guanin und Xantin miterfaßt. Diese liegen in den Epithelzellen der Darmschleimhaut jedoch in sehr geringer Konzentration vor, und es ist deshalb nicht anzunehmen, daß die Bestimmung der Proteinmenge im Homogenat durch sie wesentlich beeinflußt wurde:

B) Besprechung der Versuchsergebnisse.

Klinische Beobachtungen am Gesamttier.

Die bereits in vorausgegangenen Experimenten mit PEG beschriebenen klinischen Besonderheiten der Tiere (62) waren nicht nochmals Gegenstand unserer Untersuchungen. Dennoch konnten alle bekannten Veränderungen erneut beobachtet werden. Im Gegensatz zu keimfreien Tieren, deren Körpergewicht, nach Erreichen der Reife im üblichen Alter, dem konventioneller Ratten vergleichbar ist und bis ins Alter bleibt (31,32,33), wogen unsere Tiere nach zweimonatiger PEG - Behandlung etwa 20 % weniger als gleichaltrige Kontrolltiere. Trotz gleicher Futteraufnahme deutet dies auf einen allgemein reduzierten Ernährungszustand hin, zu dem noch die mäßige chronische Dehydrierung kommt (62). Beides dürfte durch die osmotische Diarrhoe bedingt sein.

Caecumvergrößerung.

Der Anteil des Blinddarmvolumens am Gesamtvolumen des Magen - Darm - Trakts beträgt für die weiße Ratte als Allesfresser 16.8 %. Damit liegt es zwischen dem Wert des nur Zellulose fressenden Kaninchens (31.4 %) und dem des Fleisch fressenden Hundes (1.3 %) (10). Das Caecum ist bei den Nagetieren der Ort der Zelluloseverdauung, die mit Hilfe von Mikroorganismen durchgeführt wird (bakterielle Gärkammer) (10). Seine größte Auf-

gabe besteht jedoch darin, die Faeces durch Wasserentzug einzudicken und wertvolle Elektrolyte daraus zu resorbieren. Als auffälligsten Befund induzierte die PEG - Fütterung eine starke Vergrößerung des Caecums (vgl. Abb. 1), während andere Darmabschnitte ihren ursprünglichen Zustand bewahrten. Nach zweimonatiger PEG - Aufnahme war seine Oberfläche auf das Dreifache, sein Trockengewicht auf das Doppelte angewachsen (62). Aus der Diskrepanz dieser Messungen resultiert, daß sich das Organ nicht einheitlich vergrößert und dabei seine Wand dünner wird. Diese Befunde erklären die verstärkte Transparenz der Caecumwand. Auf Grund der chronischen Diarrhoe war der Caecuminhalt breiig - flüssig und mit unverdauten Nahrungsresten durchsetzt.

Da diese Veränderungen mit den Beobachtungen am Caecum keimfreier Tiere weitgehend übereinstimmen (31,32,33), liegt der Gedanke nahe, daß der Mechanismus der Organvergrößerung in beiden Fällen derselbe ist. Daß die Caecumvergrößerung kein für keimfreie Tiere spezifischer Befund ist, sondern auch in konventionellen Ratten durch diätetische Maßnahmen erreicht werden kann, zeigen außer den hier vorliegenden Ergebnissen mehrere andere Versuche. So war das Caecum nach Verfütterung von Kaolin an Ratten merklich vergrößert und schwerer, während am Dünndarm keine Veränderungen zu sehen waren (20). Auch Diäten mit reichlich Laktose, Agar - Agar oder roher Kartoffelstärke (also schwer verdaulichen Kohlenhydraten) führten zu einer Zunahme des Caecum(trocken)gewichts. Starke Diarrhoen, besonders in der Laktose - Versuchsgruppe, wurden beobachtet (73). Ebenso war das Caecum nach Verabreichung von Antibiotika bei Ratten und Mäusen stark vergrößert, sein Inhalt vermehrt und flüssiger als normal und Diarrhoen traten auf (38, 55,84).

Die Ergebnisse dieser Experimente, auch mit keimfreien und PEG - behandelten Tieren, lassen sich auf den gemeinsamen Nenner bringen, daß sich im Caecum osmotisch wirksame Substanzen ansammeln. Diese werden entweder oral aufgenommen oder sie stammen, wie bei den keimfrei aufgezogenen Tieren (58,60), aus der endogenen Protein- und Mukopolysaccharidproduktion des

Magen - Darm - Trakts. Eine Denkmöglichkeit ist die, daß es durch den osmotisch bedingten Wassereinstrom zu einer Erhöhung des intraluminalen Drucks, zur Wanddehnung und schließlich zum Organwachstum kommt. Colon und Ileum vergrößern sich jedenfalls nicht (20,32,62), möglicherweise weil sie im Gegensatz zur sackartiger. Gestalt des Caecums offene Röhren darstellen und keinen Aufbau eines erhöhten Drucks im Lumen zulassen. Jedoch könnte ebenso eine der zahlreichen anderen Vorstellungen über die Pathogenese adaptativer Wachstumsprozesse (vgl. 34) für das Caecum zutreffen, was aber nicht Gegenstand unserer Untersuchungen war.

Hypertrophie oder Hyperplasie der Zellen?

Wir haben uns vielmehr mit der Frage beschäftigt, wie das Wachstum auf der Ebene der Nukleinsäuren- und Proteinsynthese vonstatten ging. Als grobe Parameter für die Zellmasse dienten zunächst einmal das Feucht- und Trockengewicht der Schleimhaut. Dabei fiel auf, daß das erstere rascher und im zeitlichen Verlauf abflachend, das letztere langsam, dafür aber zeitlinear zunahm. Die Diskrepanz beruhte auf einer Änderung des Wassergehalts der Schleimhaut, welcher von 75.1 % auf 82.2 % des Feuchtgewichts innerhalb weniger Tage anstieg (vgl. Tab. I). Zwischen dem vierten und vierzehnten Tag wurde dieser hohe Wert beibehalten und nahm danach wieder ab.

Auch bei keimfreien Ratten sind ähnliche Beobachtungen gemacht worden. Asano fand bei konventionellen Tieren einen Wassergehalt der Caecumwand von nur 67.8 %, bei keimfreien Ratten dagegen 73.1 %, d.h. einen um 5.3 % höheren Wert, der unseren ermittelten Daten von zirka 6 % vergleichbar ist (3). Lange und Staaland beziffern den Wassergehalt der Caecumwand bei der normalen Ratte auf 71 % (53). Unsere Daten lassen nicht unterscheiden, ob der höhere Wassergehalt der Schleimhaut auf eine Schwellung der Zellen selbst oder aber auf eine vermehrte Füllung der Interzellularspalten (vgl. Abb. 3) bzw. eine Wassereinlagerung in die Tunica propria zurückging. Da einerseits eine osmotische Schwellung des Darmepithels während aktiven Zuckertransports beschrieben wurde (13), andererseits die Caecum

- Mucosa PEG - behandelte Tiere einen erhöhten (aktiven) Natriumtransport aufweist (63,64), ist es möglich, daß die Zunahme des Wassergehalts der Schleimhaut ein Korrelat ihrer höheren funktionellen Aktivität darstellt.

Die Wasseraufnahme der Mucosa ging nach dem 7. Versuchstag wieder zurück, während das Feucht- und Trockengewicht weiter stark zunahm. Folglich mußte in der Schleimhaut auch eine echte Massenzunahme stattfinden. Um zu unterscheiden, ob diese durch Vergrößerung der Zellen infolge Einbaus verschiedener Substanzen (Hypertrophie) oder durch eine Zunahme der Zellzahl (Hyperplasie) bedingt ist, wurde eine Bestimmung der Nukleinsäuren und des Proteins durchgeführt.

Dabei zeigte sich, daß die in der Mucosa enthaltene Gesamtmenge von DNA, RNA und Protein stark zunahm (vgl. Abb. 12). Die SD - Werte der einzelnen Tiergruppen schwankten durchschnittlich um zirka 5 % stärker als die der Eichkurven (vgl. Abb. 7 bis 9), da hier nicht nur die kleinere Anzahl der Bestimmungen, sondern auch der Fehler bei der nur semiquantitativen Mucosa - Isolierung mit einging. Drückt man die Zunahme der Nukleinsäuren und des Proteins prozentual aus - wobei die bei den Kontrolltieren gefundenen Werte als 100 % angenommen wurden - stellt man fest, daß die DNA-, RNA- und Proteinmenge nach acht Wochen um etwa 100 % zugenommen hatte (vgl. Abb. 13). Da dies dem Anstieg des Mucosatrockengewichts in diesem Zeitintervall entsprach, letzteres aber erst nach deutlicher zeitlicher Verzögerung zunahm (vgl. Abb. 11), müssen andere, gewichtsmäßig bedeutende Zellbestandteile anfangs relativ vermindert sein, um später wieder in die Zellen eingebaut zu werden. Also solche kommen vor allem Lipide und Mukopolysaccharide in Frage, deren Mengen in den vorliegenden Untersuchungen nicht quantifiziert wurde. Aus Tabelle II, zusammen mit dem aus Tabelle I ablesbaren Wassergehalt läßt sich der Anteil dieser Substanzen berechnen. So beträgt bei den Kontrolltieren dieser Serie der Wassergehalt 75.1 %, der Anteil des Proteins 10.9 %, derjenige der DNA 1.1 % und der RNA - Anteil 1.6 % des Mucosafeuchtgewichts. Dies ergibt einen Prozentsatz von 11.3 % qualitativ nicht erfaßter Zellsubstanzmenge. Die gleiche Berech-

nung weist für die 4 bis 14 Tage PEG - behandelten Tiere einen Fehlbetrag von nur 1.4 bis 3.0 %, für die acht Wochen mit PEG gefütterten Tiere aber bereits wieder von 7.0 % auf. Der Lipidgehalt des Darms wird mit 6.5 % des Feuchtgewichts angegeben (18). Daß auch die Mukopolysaccharide quantitativ ins Gewicht fallen, kann nach dem histologischen Schnitt mit seinen zahlreichen PAS - positiven Becherzellen vermutet werden (vgl. Abb. 3) und stimmt mit der bekannten, ebenfalls im Bild sichtbaren, starken Schleimsekretion des Colons überein.

Die pro 100 mg Feuchtgewicht berechneten Konzentrationen der Nukleinsäuren und des Proteins waren von den Werten des Kontrolltierkollektivs nicht signifikant verschieden und blieben während der gesamten Versuchsdauer konstant. Da aber der Wassergehalt der an Gewicht zunehmenden Schleimhaut um etwa 6 % höher lag, mußten auf Grund dieser Überlegung allein niedrigere DNA-, RNA- und Proteinkonzentrationen der wachsenden Mucosa erwartet werden. Dies war jedoch nicht der Fall (vgl. Abb. 14), so daß hier ein weiterer Hinweis auf die vermutete relative Abnahme anderer, nicht erfaßter Zellbestandteile vorliegt.

Ebenso wie die Konzentrationen unterschieden sich auch die Quotienten der Nukleinsäuren und des Proteins zueinander nicht von den Werten der Kontrollgruppe und blieben während der PEG - Fütterungsdauer gleich groß. Diese Berechnungen lassen die klarste Aussage über die Kern - Cytoplasma - Relation in der Zelle zu, da dabei alle möglichen Fehlerquellen (Wassergehalt, semiquantitative Abtrennung der Mucosa, ein Teil der Verdünnungsfehler) ausgeschaltet sind. Aus der Konstanz der Quotienten folgt, daß DNA, RNA und Protein gleichmäßig zunahmen, so daß bei Versuchsende alle Zellen den gleichen Gehalt an Nukleinsäuren und Protein aufwiesen. Dies kann nur bedeuten, daß die Korrelation zwischen der Masse des Kerns und des Cytoplasmas erhalten blieb. Da im Darm als " renewing cell population " mit hoher Thymidineinbaurate (72) keine polyploiden Zellen vorkommen, ist damit bewiesen, daß die Massenzunahme der Mucosa durch eine Zunahme der Zellzahl und nicht der Zellgröße bedingt ist. Dieses Ergebnis ließ sich nicht nur aus den Untersuchungen mit der isolierten Mucosa ableiten, sondern auch aus den Experimenten mit der

abgeschabten, praktisch reinen Epithelzellfraktion (vgl. Abb. 6). Es liegt also eine *H y p e r p l a s i e* , keine Hypertrophie der Epithelzellen vor.

Unsere Befunde müssen zu dem in Beziehung gesetzt werden, was vom vergrößerten Caecum keimfreier Tiere bekannt ist. Biochemische Daten über den Nukleinsäure- und Proteingehalt liegen bei keimfreien Tieren nicht vor. Unser Ergebnis steht aber im Widerspruch zu den Schlußfolgerungen der Arbeit von Gustafsson und Maunsbach (35). Wie schon in der Einleitung erwähnt, beschrieben diese Autoren höhere Epithelzellen mit größeren Kernen und verlängertem Bürstensaum, was für eine Zellhypertrophie spräche. Die höheren Zellen könnten jedoch ebensogut dadurch bedingt sein, daß die Zellen enger zusammenstehen und in Richtung der Längsachse ausweichen. Dafür spricht auch die Beobachtung des Schlankerwerdens dieser Zellen. Auch der Eindruck vergrößerter Zellkerne und längerer Mikrovilli müßte erst durch entsprechende Messungen untermauert werden.

Unser Ergebnis eines Organwachstums durch Zellvermehrung deckt sich mit zahlreichen Befunden, wie sie an Ratten nach Dünndarmresektionen und Umgehungsoperationen teils durch histologische (19,28,95), teils durch biochemische Methoden (DNA- und Proteinbestimmungen) (29,30,76) oder auch durch Kombination beider Techniken (21,98,99) erhoben wurden. Auch unter diesen Bedingungen kommt es einerseits zur Hyperplasie des verbliebenen Darmrests (nach Resektionen), andererseits zur Hypoplasie des Epithels in der ausgeschalteten Schlinge. Lipkin (59) faßt die normale Zellzahl der ausgewachsenen Intestinalschleimhaut als Resultat eines Gleichgewichtszustands auf, der zwischen Zelltod bzw. -abschilferung auf der einen und Neuproduktion auf der anderen Seite besteht, und der durch äußere Reize (Wachstumshormon, Cortison (50), Vagotomie, Laktation, Vitamin D u.a.) uniform auf eine höhere oder tiefere numerische Ebene verschoben wird.

Reversibilität.

Nach Sistieren des Reizes sind solche Prozesse in aller Regel reversibel. Dies war auch am Caecum zu beobachten. Die bereits

makroskopisch beobachtete Rückläufigkeit der Vergrößerung nach Absetzen der PEG - Lösung (62) konnte durch quantitative Untersuchungen des Feuchtgewichts der Mucosa, sowie ihres DNA-, RNA- und Proteingehalts bestätigt werden. Dabei wurde festgestellt, daß Gewicht und Proteingehalt schneller absanken als der DNA- und RNA - Gehalt. Offenbar wurde bei der Involution ein Stadium durchlaufen, in welchem die Zellen eine verschobene Kern - Plasma - Relation im Sinne der Hypotrophie aufwiesen. Eine völlige Rückbildung der Mucosahyperplasie zu den Ausgangswerten war innerhalb der vier Wochen noch nicht eingetreten, so daß die Involution im Vergleich zur Proliferation relativ langsam verlief.

Auch von keimfreien Ratten ist bekannt, daß die Caecumvergrößerung reversibel ist, wenn den Tieren oral eine normale Bakterienflora (31,32,33) oder bestimmte Bakterienstämme (87,100) verabreicht werden. In diesem Fall zeichnet sich die Rückbildung schon nach einigen Tagen ab und ist nach drei Wochen weitgehend abgeschlossen (31,33). Auch nach Rückverlegung operativ ausgeschalteter Jejunalschlingen in die Dünndarmpassage (71) ist die Hypoplasie der Mucosa reversibel, wobei der Prozess teilweise sogar überschießend ist (21,28,29,95).

C) Beziehung zwischen Mucosahyperplasie und Transportfunktion.

Da in den früheren Untersuchungen über die Natriumtransportfunktion der adaptativ wachsenden Schleimhaut nur die Oberfläche und das Gewicht als Bezugsparameter zur Verfügung standen (62,63,64), konnte die von der Einzelzelle transportierte Natriummenge nicht ermittelt werden. Unter Verwendung der jetzt vorgelegten Daten ist dies aber möglich. Wir bezogen die früher bestimmte Menge des vom gesamten Caecum netto transportierten Natriums (in $\mu\text{Eq/h}$) auf die nunmehr gemessene DNA - Menge der isolierten Schleimhaut und trugen den Quotienten (Na - Resorption / DNA) gegen die Dauer der Fütterung auf (Abbildung 17). Berücksichtigt man, daß es sich um zwei völlig verschiedene Tierkollektive handelt (was die Angabe von Streubereichen unmöglich macht und wohl auch für das Herausfallen einzelner Werte - z.B. am 14. Versuchstag - verantwortlich ist), so läßt sich aus der

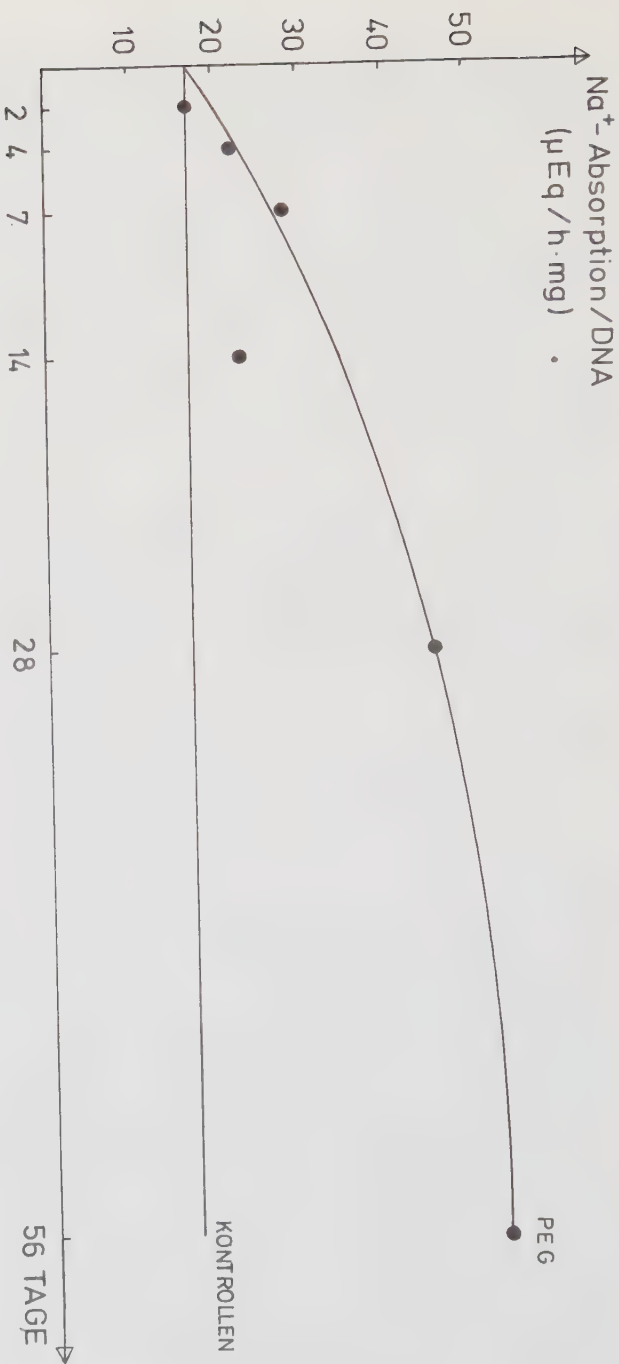


Abbildung 17

Natriummetoresorption / DNA - Menge des Rattencaecums (Ordinate) in Abhängigkeit von der Dauer der Fütterung mit Polyäthylenglykol (Abszisse). Die Natriumresorption wurde am narkotisierten Tier in vivo gemessen (63), die DNA - Menge im jetzigen Kollektiv an der isolierten Caecum - Mucosa bestimmt. Die gerade Linie gibt den arithmetischen Mittelwert der bei Kontrolltieren gefundenen Resorption an.

Abbildung eine klare Aussage gewinnen. Der entscheidende Befund liegt in der Tatsache, daß der Natriumtransport pro DNA, d.h. pro Einzelzelle, mit der Dauer der Fütterung deutlich ansteigt. Innerhalb der ersten 14 Versuchstage nimmt die Natriumresorption pro Zelle auf nahezu das Doppelte des Ausgangswertes zu, dann flacht die Kurve etwas ab, um nach zwei Monaten etwa das Dreifache des Ausgangswertes zu erreichen. Die gleiche Kurvencharakteristik ergab sich bei Bezug des Natriumtransportes auf die RNA- und Proteinmengen (nicht abgebildet).

Damit ist erwiesen, daß nicht nur die Masse aller Zellen, sondern auch die individuelle Einzelzelle mehr Natrium transportiert als normalerweise. Die Befunde beleuchten andererseits in aller Deutlichkeit die generelle Problematik der Bezugsgrößen für gemessene Transporte (57). Bei Bezug auf den DNA - Gehalt der Schleimhaut (vgl. Abb. 17) ergibt sich ein anderer Zeitverlauf als in den früheren Versuchen, in denen der Natriumtransport auf die Makro - Oberfläche bezogen wurde: in diesem Fall erreichte die Natriumresorption nach steilem Anstieg ihr Maximum schon nach 7 bis 14 Versuchstagen und blieb anschließend bis zur längsten Beobachtungszeit von zwei Monaten konstant (63).

Obwohl die DNA - Menge (als Maß für den Zellkern und damit für die Anzahl der Zellen) sicher das geeignete Maß für den Nachweis eines gesteigerten Transports pro Einzelzelle darstellt, ist anzunehmen, daß sie (bzw. der Zellkern) am Transportmechanismus nicht direkt beteiligt ist. Viel eher dürfte dies für die Zelloberfläche gelten, bzw. für bestimmte Anteile der die Zelle umgebenden Membran. Da der aktive Natriumtransport wahrscheinlich an der basolateralen Zellmembran lokalisiert ist, ist sicherlich auch die Makro - Oberfläche keine ideale, aber vielleicht noch die beste Bezugsgröße. Die basolaterale Zellfläche läßt sich praktisch nicht bestimmen und ist, da für den passiven Natriumfluß weitgehend andere Transportwege durch das Epithel angenommen werden (97), für den Nettotransport auch nicht allein bestimmend. Ein Hinweis darauf, daß die Makro - Oberfläche als Bezug für den Nettotransport brauchbar ist, ergab sich auch aus Zeitverlaufsstudien der mikrosomalen Na^+ - K^+ -

ATPase der Caecum - Mucosa PEG - behandelten Ratten (90). Die Zunahme der spezifischen Aktivität dieses Enzyms, das mit dem aktiven Natriumtransport funktionell offenbar eng verbunden ist (89), verlief der Natriumtransportsteigerung pro Makro - Oberfläche (63) genau zeitparallel.

D) Vergleiche mit morphologischen und transportphysiologischen Adaptationsphänomenen anderer Organe.

Unseren Versuchen am Rattencaecum vergleichbare Beobachtungen wurden an bestimmten Vogelarten gemacht, die sowohl im Salz- als auch im Süßwassermilieu leben können. Diese Tiere besitzen paranasal eine Drüse, die beim Aufenthalt im Süßwasser inaktiv ist, sich bei Trinken von Salzwasser jedoch vergrößert und ein natrium-, kalium- und chloridhaltiges Sekret absondert. Biochemische und histologische Untersuchungen während des Drüsenwachstums ergaben, daß an diesem Organ die Massenzunahme sowohl durch zelluläre Hypertrophie als auch durch Hyperplasie vonstatten geht (22,39,40). Wie beim Caecum kommt es auch hier zu einer zusätzlichen Steigerung der Zellfunktion, die sich in der Zunahme der spezifischen Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase und der Sekretionsrate pro Gewichtseinheit ausdrückt (25, 40). Diese Vorgänge lassen sich durch Rückversetzung der Tiere in Süßwassermilieu aufheben. Offensichtlich handelt es sich hier um einen Adaptationsprozess, der im Dienste der Salzwaterregulation der Tiere steht. Ein ähnliches Anpassungsverhalten zeigt die nach einseitiger Nephrektomie verbliebene Niere bei Ratten und Mäusen: sie nimmt an Gewicht zu, und die DNA-, RNA- und Proteinsynthese ist gesteigert (96). Johnson und Vera Roman (44) konnten zeigen, daß die Massenzunahme zu 75 % durch eine zelluläre Hypertrophie und nur zu 25 % durch eine Hyperplasie bedingt ist. Der Natriumnetttransport pro Gewichtseinheit und die spezifische Aktivität der $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase sind ebenfalls gesteigert (47,48). Da Salzdrüse und Niere jedoch im Gegensatz zum Darm expandierende Gewebe sind (34,72), ist die Beteiligung der Hypertrophie aus der Zunahme der Zellmasse verständlich. Ungeachtet des Wachstumsmodus wird in allen diesen Fällen - Salzdrüse, Niere und Darm - von " funktioneller

Hypertrophie " des betreffenden Organs gesprochen. Wir haben diese Bezeichnung auch für das Caecum übernommen, obgleich seine Vergrößerung - zumindest auf der Ebene der Epithelzellen - durch Hyperplasie zustande kommt. Wenn auch der biologische Sinn der morphologischen und funktionellen Veränderungen am Caecum noch nicht definiert werden kann, dürften sie den adaptativen Prozessen zuzurechnen sein. Dafür spricht nicht nur, daß sie eine langsam ablaufende Reaktion auf geänderte Umweltbedingungen (Diät) darstellen, sondern auch ihre große phänomenologische Ähnlichkeit mit den Anpassungserscheinungen anderer Organe wie Salzdrüse und Niere.

Zusammenfassung.

Am Caecum erwachsener Ratten induziert der Zusatz des Polymers Polyäthylenglykol zum Trinkwasser a) ein Wachstum und b) eine Steigerung der Natriumresorption pro Gewebssmasse. Das Organ dient deshalb als Modell einer intestinalen Warmblütermembran, an der ein diätetischer Reiz zu einer adaptativen Zunahme von Gewebssmasse und Elektrolyttransportfunktion führt. Bisher war weder der Wachstumsmodus noch die Transportleistung pro Einzelzelle bekannt. In den vorliegenden Untersuchungen wurde daher die Änderung der Nukleinsäure- und Proteinmenge der isolierten Mucosa in Abhängigkeit von der Dauer des Diätreizes untersucht.

- 1) Als Parameter der Gesamtgewebssmasse wurden das Feuchtgewicht und Trockengewicht der Mucosa bestimmt. Gegenüber den Werten Leitungswasser trinkender Kontrolltiere nahmen beide Größen innerhalb von zwei Monaten auf das Doppelte zu. Dabei stieg das Feuchtgewicht in den ersten Versuchstagen rasch, danach verlangsamte sich, während das Trockengewicht zeitlinear zunahm. Die Diskrepanz wird durch eine Änderung des Wassergehalts der Schleimhaut erklärt, der zwischen dem 4. und 14. Versuchstag eine Steigerung um 7 %, nach zwei Monaten um nur noch 4 % aufwies.
- 2) Die Mengen an Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA) und Protein der Mucosa nahmen in den zwei Monaten ebenfalls um etwa 100 % zu. Dagegen änderten sich die Konzentrationen der Nukleinsäuren und des Proteins pro 100 mg Feuchtgewicht nicht, und auch der Quotient dieser Substanzen zueinander - insbesondere der Quotient DNA/Protein - blieb während der Versuchsdauer konstant. Daraus folgt, daß die Massenzunahme der Schleimhaut durch eine Vermehrung (Hyperplasie) und nicht durch eine Vergrößerung (Hypertrophie) der Zellen bedingt war.
- 3) Die gleiche Schlußfolgerung ließ sich aus Experimenten mit einer praktisch reinen, durch Abschabung gewonnenen Epithelzellfraktion ziehen.
- 4) Nach Absetzen des Polymers war die Erhöhung des Feuchtgewichts und der Proteinmenge der Mucosa schneller reversibel als die der DNA- und RNA - Menge.

- 5) Da die Menge an DNA ein Maß für die Zellzahl darstellt, konnte diese zu früher ermittelten Daten des Natriumnetto- transports (63) in Beziehung gesetzt werden. Dabei ließ sich eine erhebliche Steigerung der Natriumresorption pro individueller Einzelzelle nachweisen.
- 6) Die Änderungen am Caecum weisen eine große phänomenologi- sche Ähnlichkeit mit Prozessen an anderen, den Natriumtrans- port adaptativ regulierenden Epithelien - wie der Salz- drüse mariner Vögel und der Warmblüterniere - auf. Eine Ver- größerung des Caecums wird auch nach anderen Diätreizen, und eine Natriumtransportsteigerung auch am vergrößerten Caecum keimfrei aufgezogener Ratten beobachtet.

Literaturverzeichnis.

- 1 Anderson J.W.
 A.L. Jones Biochemical and ultrastructural study of
 Glycogen in jejunal mucosa of diabetic
 rats.
 Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 145, 268 (1974)
- 2 Informationsbroschüre der Fa.Altromin
 GmbH, 4937 Lage, Lange Straße 40
- 3 Asano T. Modification of cecal size in germfree
 rats by long-term feeding of anion ex-
 change resin.
 Amer.J.Physiol. 217, 911 (1969)
- 4 Bial M. Die Diagnose der Pentosurie.
 Dtsch.med.Wschr. 28, 253 (1902)
- 5 Bochkov N.P. Morphological and physiological changes
 in the small intestine of the dog after
 its partial resection.
 Bull.Exp.Biol.Med. 46, 1261 (1958)
- 6 Booth C.C. Pathophysiologie der Dünndarmresorption.
 Internist 7, 197 (1966)
- 7 Brooks C. McC. The nature of adaptative reactions and
 their initiation.
 In: Physiology and pathology of adapta-
 tion mechanisms. Eds. E.Bajusz et al.,
 Pergamon Press: Oxford-London (1969)
- 8 Brown D.M.
 A.R. Todd Nucleotides part X.
 Some observations and chemical behavior
 of the nucleic acids.
 J.Chem.Soc. - London - Page 52 (1952)
- 9 Büchner F. Allgemeine Pathologie, 2. Auflage. Ur-
 ban & Schwarzenberg: München - Berlin
 (1956).
- 10 Buddenbrock W.v. Ernährung, Wasserhaushalt und Mineral-
 haushalt der Tiere.
 In: Vergleichende Physiologie, Band III,
 Birkhäuser: Basel - Stuttgart (1954)
- 11 Burck H.C. Histologische Technik, 3. Auflage.
 Thieme: Stuttgart (1973)
- 12 Ceriotti G. A microchemical determination of desoxy-
 ribonucleic acid.
 J.Biol.Chem. 198, 297 (1952)
- 13 Csáky T.Z.
 Esposito G. Osmotic swelling of intestinal epithelial
 cells during active sugar transport.
 Amer.J.Physiol. 217, 753 (1969)

- 14 Darwin C.R. On the origin of species by means of natural selection.
- 15 Derens J.J.
S.A. Briotmann
N. Zamcheck Effect of diet upon intestinal disaccharidases and disaccharide absorptions. J.Clin.Invest. 46, 186 (1967)
- 16 Dische Z. Eine neue charakteristische Farbreaktion der Thymonucleinsäure. Biochem.Z. 204, 431 (1929)
- 17 Dische Z.
K. Schwarz Mikromethode zur Bestimmung verschiedener Pentosen nebeneinander bei Gegenwart von Hexosen. Mikrochim. Acta 2, 13 (1937)
- 18 Documenta Geigy Wissenschaftliche Tabellen, 6. Auflage. J.R. Geigy AG.: Basel (1960)
- 19 Dowling R.H.
C.C. Booth Structural and functional changes following small intestinal resections in the rat. Clin.Sci. 32, 139 (1967)
- 20 Dowling R.H.
E.O. Riecken
J.W. Laws
C.C. Booth The intestinal response to high bulk feeding in the rat. Clin.Sci. 32, 1 (1967)
- 21 Dowling R.H.
M.H. Gleeson Cell turnover following small bowel resection and by - pass. Digestion 8, 176 (1973)
- 22 Ellis R.A.
C.C. Goertemiller
R.A. DeLellis
Y.H. Kablotsky The effect of a salt water regimen on the development of the salt glands of domestic ducklings. Developmental Biology 8, 286 (1963)
- 23 Feulgen R.
H. Rossenbeck Mikroskopisch - chemischer Nachweis einer Nukleinsäure vom Typ der Thymonukleinsäure und die darauf beruhende selektive Färbung von Zellkernen im mikroskopischen Präparaten. Z.physiol.Chem. 135, 203 (1924)
- 24 Fleck A.
D. Begg The estimation of ribonucleic acid using ultraviolet absorption measurements. Biochim.Biophys.Acta 108, 333 (1965)
- 25 Fletcher G.L.
I.M. Stainer
W.N. Holmes Sequential changes in the adenosinetriphosphatase activity and the electrolyte excretory capacity of the nasal glands of the duck (*Anas platyrhynchos*) during the period of adaptation to hypertonic saline. J.Exp.Biol. 47, 375 (1967)

- 26 Folin O.
V. Ciocalteu On tyrosine and tryptophane determinations in proteins.
J.Biol.Chem. 73, 627 (1927)
- 27 Fono A. Über die nichtenzymatische Spaltung der Oligonukleotide aus Thymonukleinsäure.
Arkiv Kemi Mineral.Geol. 24 A, No. 34 (1947)
- 28 Gleeson M.H.
J. Cullen Intestinal structure and function after small bowel by - pass in the rat.
R.H. Dowling Clin.Sci. 43, 731 (1972)
- 29 Gleeson M.H.
R.H. Dowling Biochemical changes in intestinal mucosa after experimental small bowel by - pass in the rat.
T.J. Peters Clin.Sci. 43, 743 (1972)
- 30 Gold M.S.
M.H. Hernandez Effect of intestinal resection on incorporation of ^{14}C - leucin into protein by rat intestinal slices.
E. Weser Clin.Res. 18, 37 (1970)
- 31 Gordon H.A. Keimfreie Tiere in der Forschung:
Eine Erweiterung des Konzepts der Rein-
kultur.
Triangel 7, 108 (1965)
- 32 Gordon H.
M. Wagner Characteristics of the germfree rat.
B.S. Wostmann Acta anat. 64, 367 (1966)
- 33 Gordon H.
L. Pesti The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships.
Bacteriol.Rev. 35, 390 (1971)
- 34 Goss R.J. Adaptative Growth.
Logos Press, Academic Press: New York (1964)
- 35 Gustafsson B.E.
A.B. Maunsbach Ultrastructure of the enlarged cecum in germfree rats.
Z.Zellforsch. 120, 555 (1971)
- 36 Hanson W.R.
W. Osborne Epithelial cell kinetics in the small intestine of the rat 60 days after resection of 70 per cent of the ileum and jejunum.
Gastroenterol. 60, 1087 (1971)
- 37 Harbers E. Die Nukleinsäuren.
Thieme: Stuttgart (1964)
- 38 Heggeness F.W. Effects of antibiotics on the gastrointestinal absorption of calcium and magnesium in the rat.
J.Nutr. 68, 573 (1959)

- 39 Holmes W.N.
D.J. Stewart Changes in the nucleic acid and protein composition of the nasal glands from the duck during the period of adaptation to hypertonic saline.
J.Exp.Biol. 48, 509 (1968)
- 40 Holmes W.N. Regulation of electrolyte balance in marine birds with spezial reference to the role of the pituitary - adrenal axis in the duck.
Fed.Proc. 31, 1587 (1972)
- 41 Hoppe - Seyler
Thierfelder Handbuch der physiologischen und patho-physiologischen Analyse, 10. Auflage. Band IV/II, Springer: Berlin - London - New York (1960)
- 42 Husemann B. Dünndarmausschaltung zur Therapie der extremen Adipositas.
Dtsch.med.Wschr. 98, 2343 (1973)
- 43 Jackson W.P.U.
G.C. Lindner The clinical and metabolic effects of massive intestinal resection.
Acta Med.Scand.Suppl. 306, 96 (1955)
- 44 Johnson H.A.
J.M. Vera Roman Compensatory renal enlargement. Hypertrophy versus hyperplasia.
Amer.J.Pathol. 49, 1 (1966)
- 45 Jzquierdo J.N.
S.J. Gibbs Turnover of all renewing populations undergoing circadian rhythms in cell proliferation.
Cell and tissue kinetics 7, 99 (1974)
- 46 Karlson P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 8. Auflage. Thieme: Stuttgart (1972)
- 47 Katz A.I.
M.D. Lindheimer Renal sodium- and potassium- activated adenosine triphosphatase and sodium reabsorption in the hypothyroid rat.
J.Clin.Invest. 52, 796 (1973)
- 48 Katz A.I.
F.H.Epstein The role of sodium - potassium - activated adenosine triphosphatase in the reabsorption of sodium in the kidney.
J.Clin.Invest. 46, 1999 (1967)
- 49 Kössel H. Molekulare Biologie, 1. Auflage. Klett: Stuttgart (1966)
- 50 Kodolvský O.
J.J. Herbst
J. Burke
Ph. Sunshine RNA and DNA in the intestinal mucosa during development of normal and cortisone - treated rats.
Growth 34, 359 (1970)
- 51 Kühn A. Grundri: der allgemeinen Zoologie, 16. Auflage.
Thieme: Stuttgart (1967)

- 52 Lamarck Jean B. Philosophie zoolique
Paris (1809)
- 53 Lange R. On the mechanism of water absorption
H. Staaland in the rat colon.
Comp.Biochem.Physiol. 40 A, 823 (1971)
- 54 Leblond C.P. Renewal of cell populations.
B.E. Walker Physiol.Rev. 36, 255 (1956)
- 55 Lee H.W.T. Effects of oral chlortetracycline on
J.F. Moinuddin diarrhea and on the dry weights of clean-
ed intestinal organs in rats fed two
different diets.
Amer.J.Physiol. 192, 421 (1958)
- 56 Leonhardt H. Histologie und Zytologie des Menschen,
1. Auflage.
Thieme: Stuttgart (1967)
- 57 Levin R.J. Techniques, terminology and parameters
in intestinal absorption.
Brit.med.Bull. 23, 209 (1967)
- 58 Lindstedt G. Mucus in intestinal contents of germ-
S. Lindstedt free rats.
E. Gustafsson J.Exp.Med. 121, 201 (1965)
- 59 Lipkin M. Proliferation and differentiation of
gastrointestinal cells.
Physiol.Rev. 53, 891 (1973)
- 60 Loesche W.J. Accumulation of endogenous protein in
the cecum of the germfree rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 129, 380 (1968)
- 61 Loeschke K. Water movement across the cecal wall of
H.A. Gordon the germfree rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 133, 1217 (1970)
- 62 Loeschke K. Cecal enlargement combined with sodium
E. Uhlich transport stimulation in rats fed Poly-
R. Halbach ethylene Glycol.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 142, 96 (1973)
- 63 Loeschke K. Stimulation of sodium transport and Na^+ -
E. Uhlich K^+ - ATPase activity in the hypertrophying
R. Kinne rat cecum.
Pflügers Arch. 346, 233 (1974)
- 64 Loeschke K. Adaptative Änderungen von Resorptionsvor-
gängen, speziell des Natriumtransports,
an einem hypertrophierendem Darmabschnitt.
Med.Fak.Univ.München, in Vorbereitung
(1974)
- 65 Love R. Two types of ribonucleoprotein in the
T.B. Bharadwaj nucleolus of mammalian cells.
Nature 183, 1453 (1960)

- 66 Lowry O.H.
N.J. Rosebrough
A.L. Farr
R.J. Randall Protein measurements with the folin -
phenol - reagent.
J.Biol.Chem. 193, 265 (1951)
- 67 Martini G.A.
E.O. Riecken Dünndarm - Anatomie.
In: Klinische Pathophysiologie, W. Sie-
genthaler ed. Thieme: Stuttgart (1970)
- 68 McCarthy D.M.
Y.S. Kim Changes in sucrase, enterokinase and
peptide hydrolase after intestinal re-
section. The association of cellular
hyperplasia and adaptation.
J.Clin.Invest. 52, 942 (1973)
- 69 McManus J.P.A.
K.J. Isselbacher Effect of fasting versus feeding on the
rat small intestine.
Gastroenterol. 59, 214 (1970)
- 70 Mejbaum W. Über die Bestimmung kleiner Pentosemen-
gen, insbesondere in Derivaten der Ade-
nylsäure.
Z.Physiol.Chem. 258, 117 (1939)
- 71 Menge H.
R. Bloch Morphologie und Funktion isoperistalti-
scher, ausgeschalteter Jejunalsschlingen
nach Rückverlegung in die Dünndarmpassage.
Res.Exp.Med. 161, 133 (1973)
- 72 Messier B.
C.P. Leblond Cell proliferation and migration as re-
vealed by radioautographie after injec-
tion of thymidine - H^3 into male rats
and mice.
Amer.J.Anat. 106, 247 (1960)
- 73 Moinuddin J.F.
H.W.T. Lee Possible associations of dietary resi-
dues with growth of the large gut.
Amer.J.Physiol. 197, 903 (1959)
- 74 Munro H.N.
A. Fleck The determination of nucleic acids.
Methods Biochem.Analysis XIV, 113 (1966)
- 75 Munro H.N.
A. Fleck Recent developments in the measurement
of nucleic acids in biological materials.
Analyst 91, 78 (1966)
- 76 Nakayama H.
E. Weser Adaptation of small bowel after intesti-
nal resection: increase in the pentose
phosphate pathway.
Biochim.Biophys.Acta 279, 416 (1972)
- 77 Nultsch W. Allgemeine Botanik, 2. Auflage.
Thieme: Stuttgart (1965)
- 78 Nuttall G.H.F.
H. Tierfelder Thierisches Leben ohne Bakterien im
Verdauungskanal.
Hoppe Seylers Z.Physiol.Chem. 22, 62
(1896)

- 79 Nygaard K. Resection of small intestine in rats.
III. Morphological changes in the in-
testinal tract.
Acta Chir.Scand. 133, 233 (1967)
- 80 Ogur M. The nucleic acids of plant tissues.
G. Rosen I. The extraction and estimation of de-
oxypentose nucleic acid and pentose nuc-
leic acid.
Arch.Biochem. 25, 262 (1950)
- 81 Porus R.L. Epithel hyperplasia following massive
bowel resection in man.
Gastroenterol. 48, 753 (1965)
- 82 Reifferscheid M. Chirurgie, 2. Auflage.
Thieme: Stuttgart (1972)
- 83 Richterrich R. Klinische Chemie, Theorie und Praxis,
2. Auflage.
Akad. Verlagsgesellschaft Frankfurt a. M.
(1968)
- 84 Savage D.C. Alterations in the mouse cecum and its
R. Dubos flora produced by antibacterial drugs.
J.Exp.Med. 128, 97 (1968)
- 85 Short E. The effect of cupric ions on the indole
H.R. Warner reaction for the determination of deoxy-
J.F. Koerner ribonucleic acid.
J.Biol.Chem. 243/II, 3342 (1968)
- 86 Short E. Effect of interfering substances on colo-
H.R. Warner rimetric reactions for deoxyribonucleic
J.F. Koerner acid.
Anal.Biochem. 26, 251 (1968)
- 87 Skelly B.J. Effect of a clostridium species upon ce-
P.C. Trexler cal size of gnotobiotic mice.
J. Tanami Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 110, 455 (1962)
- 88 Skou J.C. Enzymatic basis for active transport of
Na⁺ and K⁺ across cell membrane.
Physiol.Rev. 45, 596 (1965)
- 89 Skou J.C. The relationship of the (Na⁺ and K⁺) -
activated enzyme system to transport of
sodium and potassium across cell membrane.
Bioenergetics 4, 203 (1972)
- 90 Schiffel H. Inaugural - Dissertation.
Med.Fak.Univ. München, in Vorbereitung
- 91 Schmidt G. A method for the determination of deoxy-
Thannhauser S.J. ribonucleic acid, ribonucleic acid and
phosphoproteins in animal tissues.
J.Biol.Chem. 161, 83 (1945)

- 92 Schneider W.C. Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of deoxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. J.Biol.Chem. 161, 293 (1945)
- 93 Steudel H.
Peiser E. Über die Hefenucleinsäure, III. Mitteilung. Z.Physiol.Chem. 120, 292 (1922)
- 94 Thompson G.R.
Trexler P.C. Gastrointestinal structure and function in germfree or gnotobiotic animals. Gut 12, 230 (1971)
- 95 Tilson M.D.
Wright H.K. Adaptation of functioning and by - passed segments of ileum during compensatory hypertrophy of the gut. Surgery 67, 687 (1970)
- 96 Tomashefsky P.
M. Tannenbaum Macromolecular metabolism in renal compensatory hypertrophy. I. Protein Synthesis. Lab.Invest. 21, 358 (1969)
- 97 Ussing H.H.
D. Erlij
H. Lassen Transport pathways in biological membranes. Ann.Rev.Physiol. 36, 17 (1974)
- 98 Weser E. Intestinal adaptation to small bowel resection. Amer.J.Clin.Nutr. 24, 133 (1971)
- 99 Weser E.
H. Hernandez Studies of small bowel adaptation after intestinal resection in the rat. Gastroenterol. 60, 69 (1971)
- 100 Wiseman R.F.
H.A. Gordon Reduced levels of bioactive substance in the cecal content of gnotobiotic rats monoassociated with Salmonella typhimurium. Nature (London) 205, 572 (1965)
- 101 Wohlleben G. Entfernung von Alkohol aus Chloroform. Angewandte Chemie 68, 752 (1956)

Lebenslauf

Geboren am 28. Oktober 1945 als 2. Sohn der Beamtenseheleute Luitpold und Therese Resch in Landshut.

Besuch der St. Nikola - Volksschule und des Hans - Leinberger -
- Gymnasiums in Landshut mit Abitur 1967.

Beginn des Studiums der Naturwissenschaften an der Universität München im WS 1967/68, im SS 1968 Wechsel zum Fach Humanmedizin.

Ablegung der naturwissenschaftlichen Vorprüfung im SS 1969.

Ablegung der ärztlichen Vorprüfung im SS 1971.

Seit 22.12.1973 verheiratet.

Staatsexamen im SS 1974.

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. med. K. Loeschke für die freundliche Überlassung des Themas, für viele wertvolle Anregungen, Ratschläge und Diskussionen sowie für die kritische Korrektur der Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. E. Buchborn für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Dr. rer. nat. W. Kleinow vom Institut für Physiologische Chemie der Universität München danke ich für die Beratung bei der biochemischen Methodik.

